

Allosterische Kontrolle der Bindung von T-Antigen an SV40-DNA durch Purinnukleosidtriphosphate

Brigitte Vogt

**ALLOSTERISCHE KONTROLLE DER BINDUNG VON T-ANTIGEN
AN SV40-DNA DURCH PURINNUKLEOSIDTRIPHOSPHATE**

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität, München

vorgelegt
von
Brigitte Vogt

am
2. April 1986

Tag der mündlichen Prüfung: 28.5.1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning-Honegger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Für meine Eltern

Nicht Kunst und Wissenschaft allein,
Geduld will bei dem Werke sein.

(Goethe, Faust)

Diese Arbeit wurde auf Anregung von Frau Prof. Dr. Ellen Fanning-Honegger in ihrem Labor durchgeführt. Ich möchte ihr an dieser Stelle sehr herzlich für die Unterstützung danken, die sie sowohl mir persönlich als auch dieser Arbeit jederzeit zuteil werden ließ. Ebenso danke ich ihr für die vielen Anregungen und hilfreichen Diskussionen im Verlauf der letzten Jahre, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Für das Überlassen von Hybridomzellen und monoklonalen Antikörpern danke ich Dr. E. Gurney, Dr. W. Deppert, Dr. R. Ball, Dr. E. Harlow und Dr. David Lane, für den Ad2*D2-Virusstamm Dr. E. Baumann, sowie Dr. Avril Arthur für die mutierten T-Antigene T_{pst} und T_{indIII}.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitgliedern des Arbeitskreises für die freundschaftliche Atmosphäre und hilfreiche Diskussionen, sowie Sabine Garbrecht, Wolfgang Traut, Silke Dehde, Michael Böhm und meiner Mutter für das Korrigieren des Manuskripts.

Besonders danke ich unseren technischen Assistentinnen Gabi Hartmann, Ursula Markau und Silke Dehde für ihre tatkräftige Hilfe und Andrea Schmid für die Anfertigung der Photographien.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Das SV40-Virus	1
1.2. Die Organisation des SV40-Virus-Genoms	2
1.3. Die Vermehrung des SV40-Virus	4
1.4. Die frühe Virusregion	4
1.5. Das große T-Antigen	5
1.6. Aufgabenstellung	6
2. Material	8
2.1. Zelllinien	8
2.2. Virusstämme	9
2.3. Plasmide	9
2.4. Andere mutierte T-Antigene	9
2.5. Restriktionsenzyme	10
2.6. Chemikalien und andere Enzyme	10
3. Methoden	15
3.1. Zellkultivierung	15
3.2. Aufzucht von mutiertem Virus Ad2'D2	16
3.3. Infektion von TC7-Zellen	16
3.4. Herstellung von T-Antigen enthaltendem Zellextrakt	16
3.5. Sedimentationsanalyse von Cytoplasma-Kern-Extrakten	17
3.6. Isolierung von Plasmid-DNA	18
3.6.1. Alkalischer Schnellaufschluß	18
3.6.2. Plasmidisolierung über Dichtegradientenzentrifugation	20
3.7. Spaltung von Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease HindIII	21
3.8. Agarose-Gel-Elektrophorese	21
3.9. Radioaktive Markierung der 5'-Enden von DNA nach Restriktionsschnitt	22
3.9.1. Dephosphorylierung	22

3.9.2. 5'-Endmarkierung der dephosphorylierten DNA	23
3.10. Präparation der Staphylococcus aureus-Bakterien	23
3.11. Reinigung der monoklonalen Antikörper	23
3.12. Immunpräzipitation von SV40-DNA	24
3.13. Markierung von T-Antigen an der ox-ATP-Affinitätsmarkierungsstelle	25
3.13.1. Oxidation von α - ^{32}P -ATP, α - ^{32}P -GTP und α - ^{32}P -UTP	26
3.13.2. Reaktion mit T-Antigen	26
3.14. Laemmli-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
3.15. ATPase-Reaktion	27
3.15.1. Präparation des Zellextrakts	27
3.15.2. ATPase-Reaktion	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Auswirkungen der Zugabe von Nukleotiden auf die T-Antigen-DNA-Bindung	29
4.1.1. Inhibition und Nukleotidspezifität	29
4.1.2. Konzentrationsabhängigkeit und Einfluß auf die verschiedenen Bindungsstellen	31
4.1.3. Untersuchungen zum Einfluß von Antikörpern auf die T-Antigen-DNA-Bindung und auf deren Inhibition durch ATP	34
4.1.4. Untersuchung möglicher Wirkungsweisen der ATP-induzierten DNA-Bindungsinhibition	39
4.1.5. Einfluß von ATP auf einige von verschiedenen Zelllinien exprimierte T-Antigene	48
4.1.6. Reversibilität der Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung	50
4.1.7. Nachweis von Allosterie durch mutierte T-Antigene	56
4.2. Lokalisation der allosterischen Nukleotidbindungsstelle	61
4.2.1. Untersuchungen zur ox-ATP-Bindungsstelle als möglicher allosterischer	61

Nukleotidbindungsstelle	
4.2.2. Untersuchungen zur ATPase-Substrat- bindungsstelle	65
5. Diskussion	68
5.1. Inhibition und deren mögliche Wirkungs- mechanismen	68
5.2. Vergleich der allosterischen Nukleotid- bindungsstelle mit der ox-ATP-Bindungsstelle	70
5.3. Vergleich der allosterischen Nukleotid- bindungsstelle mit der ATP-ase-Substrat- bindungsstelle	73
5.4. Mögliche Auswirkungen der allosterischen Nukleotid-Bindung des T-Antigens auf den zellulären Infektionszyklus	75
6. Zusammenfassung	79
7. Literaturverzeichnis	80
8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	90

Verzeichnis der Abbildungen:

1.1. Schematische Repräsentation des SV40-Genoms	3
2.1. Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide	10
2.2. Schematische Darstellung der mutierten T-Antigene	12
4.1. Nukleotidspezifität der Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung	30
4.2. Untersuchung der inhibierenden Wirkung verschiedener ATP-Analoga	32
4.3. Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung als Funktion der Nukleotidkonzentration	33
4.4. Adenosinribonukleotide inhibieren die Bindung des T-Antigens sowohl an Bindungsstelle I als auch an Bindungsstelle II im SV40-Replikationsursprung	35
4.5. T-Antigen dissoziiert unter Zugabe von ATP nicht vom vorgeformten Komplex aus monoklonalem Antikörper und T-Antigen	37
4.6. ATP-Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens unter Verwendung von acht verschiedenen Antikörpern	38
4.7. Einfluß eines zweiten monoklonalen Antikörpers auf die ATP-induzierte Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens	40
4.8. ATP inhibiert SV40 DNA-Bindung von T-Antigen auch im Zellrohextrakt	41
4.9. Untersuchung verschiedener Bedingungen zur ATP-Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung	43

4.10. ATP-induzierte Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung in Anwesenheit chelatierender Agentien	46
4.11. Einfluß von ATP auf die DNA-Bindungsaktivität von T-Antigenen, welche von verschiedenen Zelllinien exprimiert werden	49
4.12. Einfluß von ATP auf die DNA-Bindung der verschiedene oligomeren Formen des T-Antigens	51
4.13. Versuch zur Reversibilität der Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens	53
4.14. Reversibilität der Nukleotidinhibition der T-Antigen-DNA-Bindung	54
4.15. Modell für die allosterische Inhibition der T-Antigen DNA-Bindungsaktivität durch Purinnukleotide	57
4.16. D2-T-Antigen zeigt keinerlei Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens	59
4.17. Eine in E.coli exprimierte Deletionsmutante zeigt keinerlei Inhibition der DNA-Bindung, die Markierung durch oxATP bleibt jedoch erhalten	60
4.18. T-Antigen zeigt auch bei Affinitätsmarkierung eine breite Nukleotidspezifität	63
4.19. Komplexierung von T-Antigen mit oxidierten kalten Nukleotiden zeigt keinen inhibitorischen Effekt auf die DNA-Bindung	64
4.20. Tabellarische Darstellung der ATPase-Aktivität unter Einfluß verschiedener Nukleotide	67

1. Einleitung

1.1. Das SV40-Virus

Der natürliche Wirt des Simian Virus 40 (SV40) ist der Affe. Da Affennierenzellen in früherer Zeit zur Gewinnung von Impfstoffen gegen Polioviren benutzt wurden, wurden Affenzellen systematisch auf endogene Viren untersucht. So gefundene Affenviren wurden mit aufeinanderfolgenden Zahlen benannt, SV (Simian Virus) 1, SV 2 und so weiter. Da das SV 40 Virus in Rhesusaffen, die früher hauptsächlich für die Vaccingewinnung verwendet wurden, keine erkennbaren cytopathischen Effekte zeigt, wurde es erst sehr spät entdeckt. Nämlich dann, als man die Zellen der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops sabacus*) zur Impfstoffgewinnung zu benutzen begann (Sweet and Hilleman, 1960). Man untersuchte sofort Proben der Impfstoffe und fand, daß das Virus in diesen z.T. in beträchtlichen Mengen vorhanden war. Dies war umso beunruhigender, als man kurz nach seiner Entdeckung festgestellt hatte, daß SV40 in neugeborenen Hamstern Tumoren erzeugt (Eddy et al., 1962; Girardi et al., 1962). Es konnte aber durch Reihenuntersuchungen nachgewiesen werden, daß bei Menschen, die mit viruskontaminierten Impfstoffen behandelt worden waren im Vergleich zu einer Kontrollpopulation kein erhöhtes Krebsrisiko festzustellen war. Seither hat sich das SV40 Virus zum beliebten und gut manipulierbaren Forschungsobjekt zur Aufklärung der Grundlagen der Zelltransformation und Tumorentstehung entwickelt.

SV 40 wird heute zur Gruppe der Papovaviren (Pappilloma-, Polyoma-, Vacuolating Virus; letzterer ist der alte Name für SV40 vor der Einreihung in die Simian Viren) gezählt (Melnick, 1962); vor allem mit Polyoma Virus hat es viele Gemeinsamkeiten, jedoch eine andere Zellspezifität. Während SV40 sich in Affenzellen lytisch vermehrt und nur in

Mauszellen Tumoren induzieren kann, ist die Maus für Polyoma Virus der lytische Wirt.

Ebenfalls zu dieser Gruppe von DNA Tumor Viren gehören die menschlichen Viren JC und BKV. All diesen Viren gemeinsam ist, daß sie sehr klein sind (45-55 nm Durchmesser), ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Molekül enthalten und von einer icosaedrischen Proteinhülle umgeben sind. Diese Hüllproteine sind viruskodiert, während die die DNA zu Nukleosomen organisierenden Histonproteine nicht viruskodiert, sondern der Wirtszelle entnommen sind (Tooze, 1981).

1.2. Die Organisation des SV40 Virus-Genoms

Ein SV40 Virion hat einen Durchmesser von ungefähr 45 nm und enthält ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Molekül von 5243 Basenpaaren (bp), welches 12% der gesamten Virusmasse darstellt. Diese DNA kodiert für zwei Teilregionen: jeweils vom Replikationsursprung (origin of replication) aus werden bidirektional zuerst die frühe Region (early region) mit den Genen für das große und das kleine Tumorantigen (T- und t-Antigen), dann die späte Region (late region), kodierend für die Virushüllproteine VP 1, 2 und 3 und das Agnoprotein, transkribiert.

Das Virusgenom (Abb.1.1) wurde in zwei verschiedene Kartierungen eingeteilt: ausgehend vom origin of replication und der dort vorhandenen BglI- Restriktionsschnittstelle werden die Basenpaare im Uhrzeigersinn gezählt. Die andere Einteilung erfolgte in Kartierungseinheiten von 0-1 mit der einzigen EcoRI Schnittstelle als Ausgangs- und Endpunkt. Der origin of replication liegt nach dieser Einteilung bei 0.67 Kartierungseinheiten (Tooze, 1981).

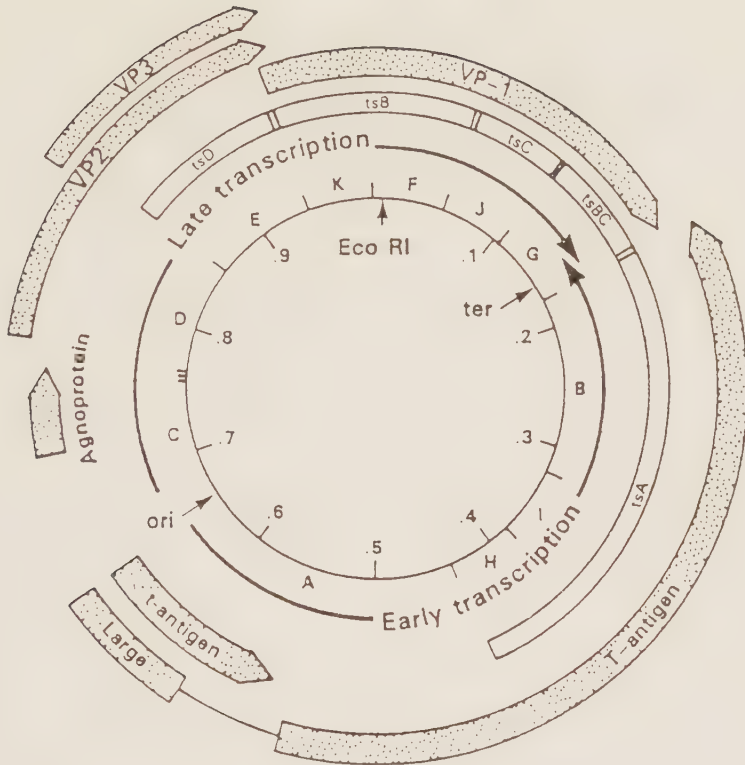


Abb. 1.1.1.: Schematische Repräsentation des SV40-Genoms
(aus O'Brian, 1984; nach Fiers et al., 1978)

Das SV40-Genom ist hier mit Angabe der Kartierungseinheiten, ausgehend von der einzigen EcoRI-Schnittstelle, gezeigt. Dargestellt sind die für die Virusproteine kodierenden Bereiche, die Bereiche der "frühen" und "späten" Transkription, sowie die für die temperatursensitiven Phänotypen wichtigen Genabschnitte (tsA, B, C, D) und die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen HindII und HindIII.

1.3. Die Vermehrung des SV40 Virus

Das SV40 Virus vermehrt sich in permissiven Zellen, z.B. Affenzellen, lytisch. Dazu wird nach Virusaufnahme die Proteinhülle von zellulären Enzymen im Zellkern abgebaut, die virale DNA verbleibt im Kern und 10-12 Stunden nach Virusaufnahme können die Transkriptionsprodukte der frühen Gene, das große und das kleine Tumorantigen, nachgewiesen werden. Das große T-Antigen stimuliert sodann die Synthese einiger zellulärer Proteine (DNA-Ligase- und DNA-Polymerase α -Synthese werden beispielsweise auf das 4-10fache gesteigert), worauf 12-15 Stunden nach Infektion die Replikation von viraler und zellulärer DNA beginnt. Danach werden unter Autoregulation der frühen Region die Produkte der späten Region, die Virushüllproteine VP1-3 und zuletzt das Agnoprotein, hergestellt. Infektiöses Virus entsteht auf diese Weise zwischen 20-25 und 60-70 Stunden nach Infektion, die Zelle wird lysiert und die Tochterviruspartikel freigesetzt.

1.4. Die frühe Virusregion

Die frühe Virusregion des SV40 Virus kodiert für zwei Proteine: das große T-Antigen mit einem Molekulargewicht von ca. 94 kD und das kleine t-Antigen mit Gewicht 17 kD. Durch Experimente mit Deletionsmutanten, die kein kleines t-Antigen produzieren, konnte gezeigt werden, daß dieses weder für die Transformation in vitro, noch für die Entstehung eines Tumors in vivo nötig ist (Lewis and Martin, 1979; Martin et al., 1979; Topp et al., 1981). Mit temperatursensitiven, nur das große T-Antigen betreffenden tsA-Mutanten konnte weiter festgestellt werden, daß Expression des großen T-Antigens für die Initiation und auch für die Aufrechterhaltung der Transformation essentiell ist (Martin, 1981). Das kleine t-Antigen mag für die Qualität des Transformationsereignisses verantwortlich sein, es ist

dafür jedoch nicht unverzichtbar (Graessmann et al., 1980; Topp and Rifkin, 1980).

Aus diesem Grund beschäftigen sich die meisten Arbeiten auf dem Gebiet der SV40-Forschung mit dem großen T-Antigen, da es das tatsächlich transformierende und tumorerzeugende Agens des SV40 Virus zu sein scheint.

1.5. Das große T-Antigen

Das große SV40 T-Antigen wurde erstmals von Tegtmeyer, 1972, beschrieben. Es befindet sich im Zellkern und ist verantwortlich für viele biochemische Reaktionen. Außer seiner Funktion bei der Transformation wird auch der lytische Infektionszyklus hauptsächlich vom großen T-Antigen gesteuert. Das T-Antigen ist ein multifunktionelles Protein, das unter anderem für die Regulation der Expression der frühen und späten Regionen und für die Initiation der Replikation viraler und zellulärer DNA verantwortlich ist. Abgesehen davon ist es möglich, daß das T-Antigen auf Grund seiner biochemischen Eigenschaften auch auf andere Art in den Zellmetabolismus eingreift. Die bisher bekannten Eigenschaften des T-Antigens sind vielfältig: Bindung an zwei genau definierte Stellen (Bindungsstellen I und II) innerhalb des SV40 Replikationsursprungs, Bindung an das zelluläre Protein p53, Nukleotidbindung und Spaltung von ATP und dATP sind nur einige davon (Rigby and Lane, 1983).

Die Bindung von T-Antigen an Sequenzen der SV40 Kontrollregion scheint besonders wichtig zu sein, diese Bindung vermittelt nämlich die zeitlich koordinierte Autoregulation der frühen Gene (Rio et al., 1980; Hansen et al., 1981; DiMaio and Nathans, 1982), die Initiation der viralen DNA-Replikation (Shortle et al., 1979; DiMaio and Nathans, 1980; Margolskee and Nathans, 1984), sowie die Stimulation der Expression der späten Gene (Brady et al., 1984; Keller and Alwine, 1984, 1985; Brady and Khoury, 1985). Für die virale DNA-Replikation soll außerdem die

ATPase-Aktivität nötig sein (Clark et al., 1983) und darüberhinaus eine bisher noch unbekannte Aktivität (Stillman et al., 1985).

Das T-Antigen scheint aus verschiedenen Domänen zu bestehen, die jeweils mit bestimmten Eigenschaften des Proteins korreliert werden können. Dies schließt man daraus, daß mit Hilfe von SV40-Mutanten und Hybridproteinen die DNA-Bindungsdomäne einer aminoterminalen Region (Prives et al., 1982; Clark et al., 1983; Morrison et al., 1983) zugeordnet werden konnte, während man die ATPase-Aktivität auf diese Weise einer Domäne am Carboxyterminus des Proteins zuschrieb. Eine carboxyterminale Nukleotidbindungsstelle wurde ebenfalls gefunden (Clertant et al., 1984).

Das große T-Antigen liegt in drei verschiedenen oligomeren Formen vor: als Monomer mit dem Sedimentationskoeffizienten 5S; dieses T-Antigen ist vermutlich das neu synthetisierte, das dann zum Dimer mit 7S oder zum Tetramer mit 14-16S Sedimentationskoeffizient aggregiert (Fanning et al., 1981; Fanning et al., 1984). Wahrscheinlich erfolgt die Bindung an DNA als Monomer und erst während oder nach der DNA-Bindung erfolgt die Tetramerisierung. Außerdem existiert in der Wirtszelle ein Assoziat mit dem zellulären Protein p53, welches mit 22-23S sedimentiert (Lane und Crawford, 1980; McCormick and Harlow, 1980).

1.6. Aufgabenstellung

Die biochemischen Eigenschaften einer Anzahl prokaryontischer Proteine, die an der DNA-Replikation und -Rekombination beteiligt sind, wurden bisher bereits genauer untersucht. Die DNA-Bindungseigenschaften mancher dieser Proteine werden durch Nukleotidbindung beeinflusst. Die Bindung von dnaB-Protein an einzelsträngige DNA beispielsweise wird durch ATP und andere Ribonukleotidtriphosphate allosterisch aktiviert (Arai und

Kornberg, 1981). Ebenso ist für die sequenzspezifische Bindung der Tn3-Transposase an die "inverted repeats" des Transposons ATP nötig (Wishart et al., 1985).

HeLa-Topoisomerase I-Aktivität dagegen wird von millimolaren Mengen ATP bereits vollständig inhibiert. Auch sind in eukaryontischen Zellen DNA-abhängige ATPasen bekannt, die bei der zellulären DNA-Replikation eine Rolle spielen und deren Aktivität von der ATP-Konzentration bzw. von dem ATP/ADP-Verhältnis moduliert wird.

Diese Untersuchungen warfen die Frage auf, ob die DNA-Bindungsaktivität des SV40 T-Antigens ebenfalls durch seine Nukleotidbindungsaktivität beeinflusst wird. Außerdem war es interessant zu untersuchen, ob die verschiedenen Domänen des T-Antigens und die ihnen zugeschriebenen Funktionen voneinander unabhängig sind, oder ob sie sich gegenseitig beeinflussen können.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob und inwieweit Nukleotide auf die DNA-Bindung des T-Antigens Einfluß haben.

2. Material

2.1. Zelllinien:

Folgende Zelllinien wurden in DME-Medium mit den genannten Zusätzen gehalten und für die Versuche verwendet:

TC7	Affennierenzellen (Robb and Huebner, 1973), Medium: 8% Serum neugeborener Kälber
VLM	SV40 transformierte Balb/c Mausembryozellen (Zarling und Tevethia, 1973) Medium: 8% Serum neugeborener Kälber
mKSA	SV40 transformierte Balb/c Mausnierenzellen (Dubbs et al., 1967, Kit et al., 1969) Medium: 5% fötales Kälberserum
H65/90B	durch ^{60}Co bestrahlten SV40 Virus induzierte Tumorenzelllinie von Syrischem Hamster (Defendi und Jensen, 1967) Medium: 8% Serum neugeborener Kälber
THK-1 ¹	SV40 transformierte Nierenzellen vom Syrischen Hamster (Black and Rowe, 1963) Medium: 8% Serum neugeborener Kälber
COS1	von klonierten, origin-defekten SV40 Mutanten transformierte CV1-Affennieren-Zelllinie (Gluzman, 1981) Medium: 5% fötales Kälberserum
HeLa	Zelllinie eines menschlichen Gebärmutterkarzinoms (Gey et al., 1952) Medium: 8% Serum neugeborener Kälber

Folgende Hybridomzelllinien wurden in 15% fötales Kälberserum enthaltendem DME-Medium kultiviert und zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern verwendet:

Hyb 108 (Gurney et al., 1986)

Hyb 1630 (Ball et al., 1985)
 Hyb 204 (Clark et al., 1981)
 Hyb 205 (Clark et al., 1981)
 Hyb 402 (Harlow et al., 1981)
 Hyb 405 (Harlow et al., 1981)
 Hyb 416 (Harlow et al., 1981)
 Hyb 419 (Harlow et al., 1981)

2.2. Virusstämme:

Zur Infektion von TC7-Zellen wurde SV40 Wildtyp-Virus, Stamm SV-S (Takemoto et al., 1966), verwendet. Zur Präparation des D2-T-Antigen wurden HeLa-Zellen mit Ad2+D2-Hybrid-Virus (Hassell et al., 1978), der freundlicherweise von Dr. E. Baumann, Konstanz, zur Verfügung gestellt worden war, infiziert.

2.3. Plasmide:

Als DNA für die Bindungsexperimente wurden die Plasmide pSV-Wt (Fanning et al., 1982) und p1097 (Huber et al., 1985) verwendet. pSV-Wt enthält die gesamte Nukleotidsequenz des SV40-Virus, kloniert in die einzige BamHI-Schnittstelle des Plasmids pAT 153 (Twigg and Sherratt, 1980).

Das Plasmid p1097 enthält die SV40 Deletionsmutante csl097 (DiMaio and Nathans, 1982), in welcher die gesamte T-Antigen Bindungsstelle I im SV40 Replikationsursprung deletiert ist, ebenfalls kloniert in die BamHI-Schnittstelle des Plasmids pAT 153, jedoch in umgekehrter Orientierung. Eine schematische Darstellung der Plasmide und ihrer HindIII-Schnittstellen ist in Abb. 2.1. dargestellt.

2.4. Andere mutierte T-Antigene:

Die beiden T-Antigen-Mutanten T_{Pst} und T_{HindIII} wurden durch Expression von Plasmiden in E.coli erhalten (A.Arthur,

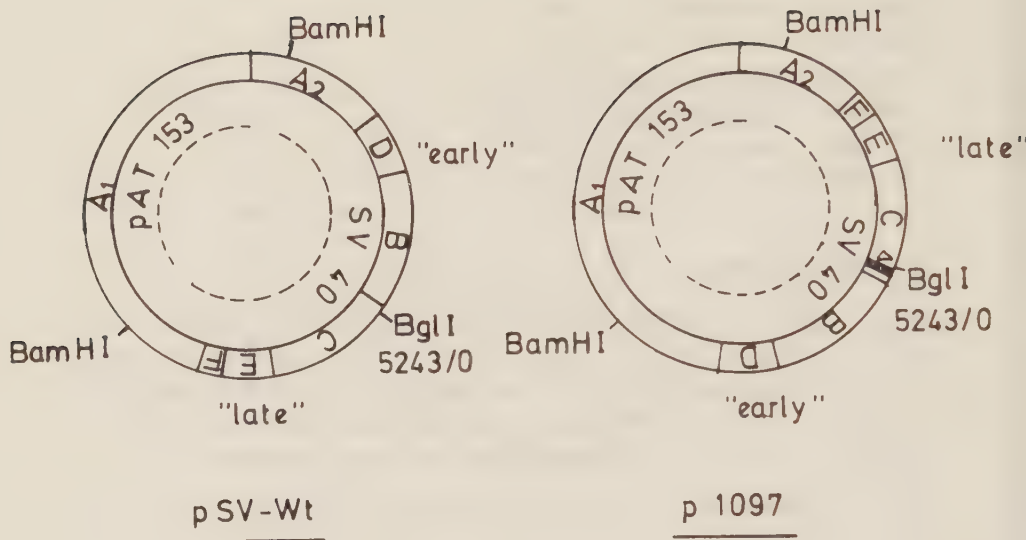


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide

Zur Untersuchung der Bindung von T Antigen an DNA wurden die beiden Plasmide pSV-Wt und p1097 verwendet. Das Plasmid pSV-Wt erhält das gesamte SV40-Genom (5243 bp), integriert in die einzige BamHI-Schnittstelle des Plasmids pAT 153 (3657 bp, Twigg and Sherratt, 1980). Die Orientierung der SV40-DNA ist gekennzeichnet, ebenso die HindIII-Restriktionsfragmente. Das Plasmid p1097 enthält ebenfalls das SV40-Genom, integriert in die BamHI-Schnittstelle von pAT 153, jedoch in der umgekehrten Orientierung und mit einer Deletion von 31 bp im HindIII-C-Fragment (DiMaio and Nathans, 1982). Durch die Integration der SV40-DNA in umgekehrter Orientierung gegenüber pSV-Wt verändert sich bei Restriktionsverdauung mit HindIII die Größe des A₂-Fragments derart, daß bei Auftrennung im Agarosegel ein Dublett aus den Fragmenten A₂ und B entsteht.

persönliche Mitteilung). Diese Plasmide enthalten die für das große T-Antigen kodierenden Sequenzen des SV40 Virus, ohne die Intronsequenzen, bis zur dort vorhandenen PstI- bzw. HindIII-Schnittstelle, kloniert in den Vektor pUC9. Das T_{Pst}-Antigen reicht daher vom Aminoterminus bis zur Aminosäure 537, das T_{HindIII}-Antigen vom Aminoterminus bis zur Aminosäure 272 (Abb.2.2).

Diese Mutanten wurden von Dr.A.Arthur zur Untersuchung ihrer DNA-Bindung und deren Inhibition durch Nukleotide freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.5. Restriktionsenzyme:

Das Restriktionsenzym HindIII wurde von den Firmen Amersham, Biolabs und Renner bezogen und entsprechend der angegebenen Bedingungen verwendet.

2.6. Chemikalien und andere Enzyme:

Firma Amersham und Buchler, Braunschweig:

α -³²P-ATP (3000 Ci/mmol), α -³²P-GTP (3000 Ci/mmol),
 α -³²P-UTP (3000 Ci/mmol), γ -³²P-ATP (3000 Ci/mmol),
 γ -³⁵S-ATP S (600 Ci/mmol), Biotin-markiertes
 Mausimmunglobulin, Streptavidin-Meerrettichperoxidase
 Komplex, Polynukleotidkinase.

Firma Beckman, München:

Ready Solv EP

Firma Biochrom KG, Berlin:

Fötale Kälberserum, Serum neugeborener Kälber.

Firma Boehringer, Mannheim:

Alkalische Phosphatase, Adenylyl-imidodiphosphat (AMP-PNP),
 Adenylyl(β , γ -methylen)-diphosphat (AMP-PCP),

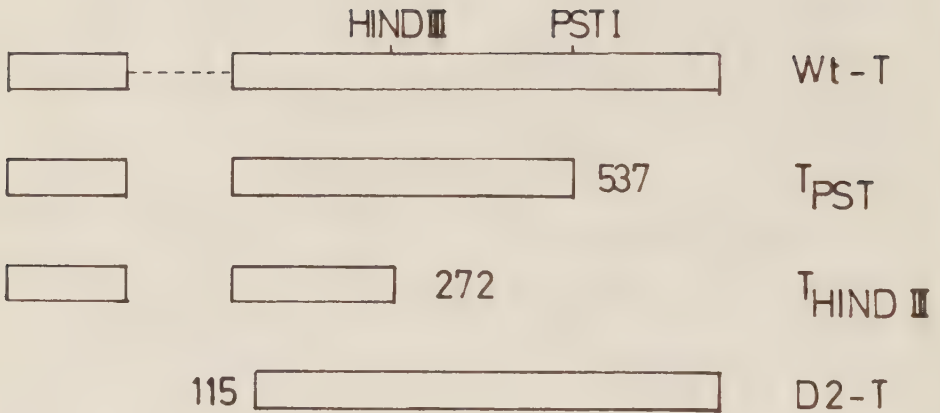


Abb.2.2.: Schematische Darstellung der mutierten T-Antigene

Außer Wildtyp-T-Antigen wurden für die Versuche die oben abgebildeten mutierten T-Antigene T_{Pst} , $T_{Hind III}$ und D2 verwendet. Die T-Antigene T_{Pst} und $T_{Hind III}$ enthalten die Sequenzen des T-Antigens vom Aminotermius bis zur Aminosäure 537 bzw. 272, die SV40-Sequenzen des D2-T-Antigens beginnen erst bei Aminosäure 115 und reichen bis zum Carboxyterminus.

B-Galaktosidase, Nicotinamiddinukleotid (NAD⁺), Serum neugeborener Kälber.

Firma Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar, Hefe-Extrakt, Trypton.

Firma Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm:

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid,
Natriumcyanoborhydrid.

Firma Gibco Europe GmbH, Karlsruhe:

DME, Fötales Kälberserum, Serum neugeborener Kälber.

Firma Kodak Limited:

Röntgenfilme X-Omat S.

Firma E. Merck AG, Darmstadt:

Borsäure, Kalziumchlorid, Chloroform, Diethylether,
Dinatriumhydrogenphosphat,
Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA),
Ethanol p.A., Essigsäure p.A., Glucose, Glycerol, Glycin,
Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumacetat,
Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat,
2-Mercaptoethanol, Natriumacetat, Natriumazid,
Natriumcarbonat, Natriumdodecylhydrogensulfat (SDS),
Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat,
Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid,
Natriummetaperjodat, Natriumtetraborat, Nickelchlorid,
Perhydrol 30%, Phenol, Phosphorsaure 85%, Salzsäure 25%,
Sucrose, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris),
Zinkchlorid.

Firma Nunc GmbH, Wiesbaden:

Gewebekulturschalen.

Firma Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

Polynukleotidkinase, Protein-A-Sepharose CL-4B.

Firma Serva, Heidelberg:

Acrylamid, Ammoniumperoxodisulfat, Ampicillin,
Bromphenolblau, Hämoglobin, Kanamycin, Lysozym,
N,N'-bis-methyl-acrylamid, Penicillin, Streptomycin,
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin, Trypsin, Triton X-100.

Firma Sigma:

Adenin, Adenosin-5'-diphosphat (ADP),
Adenosin-5'-monophosphat (AMP), Adenosin-5'-triphosphat
(ATP), Adenosin-5'-O-(3-thiotriphosphat) (ATP_γS),
Adenosin-5'-O-(2-thiotriphosphat) (ATP_βS),
Adenosin-2',3'-monophosphat cyclisch (cAMP),
Cytosin-5'-triphosphat (CTP),
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP),
2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat (dCTP),
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP), Dithiothreitol
(DTT),
Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)N,N'-Tetraessigsäure
(EGTA), Glycogen, Guanosin-5'-triphosphat (GTP),
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes),
2(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES),
o-Nitrophenyl-β-galaktosid, p-Nitrophenylphosphat-Tabletten,
Nonidet P-40, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF),
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfon-säure) (PIPES),
Ribonuklease-A vom Rinderpankreas, Rinderserumalbumin,
Spermidin, Triethanolamin, Thymidin-5'-triphosphat,
Uridin-5'-triphosphat.

3. Methoden

3.1. Zellkultivierung:

Die verschiedenen Zelllinien wurden auf Kollagen-beschichteten Gewebekulturschalen mit Durchmesser 140 mm bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Dem Medium (DME) wurden hierzu für COS1 und mKSA Zellen 5% fötales Kälberserum, für HeLa, TC7, VLM, H65/90B, THK-1^t-Zellen 8% Serum von neugeborenen Kälbern zugegeben. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage je nach Wachstum passagiert indem sie durch fünfminütiges Inkubieren mit Trypsinlösung von der Platte gelöst, durch Zentrifugieren pelletiert, in frischem Medium aufgenommen und entsprechend verdünnt auf neue Gewebekulturschalen verteilt wurden.

Die Hybridomzellen wurden als Suspensionskultur mit 15% fötalem Kälberserum gehalten.

Trypsinlösung: 8,0 g NaCl

0,2 g KCl

0,2 g KH₂PO₄

1,25 g Na₂HPO₄

1,25 g Trypsin (1:250)

1,25 g EDTA

in 800 ml destilliertem Wasser gelöst und

0,1 g CaCl₂ x 2 H₂O

0,1 g MgSO₄ x 7 H₂O

in 200 ml destilliertem Wasser gelöst, wurden zusammengegeben und steril filtriert.

DME: Dulbecco-modifiziertes Eagle's Medium (DME von Gibco)

mit zusätzlich

40 mg/l Penicillin

80 mg/l Streptomycin

100 mg/l Kanamycin

44,6 mM NaHCO₃

3.2. Aufzucht des mutierten Virus Ad2⁺D2

Um das Hybridprotein D2-T, bestehend aus einem Teil des T-Antigens und Adenovirussequenzen, zu erhalten, wurde dazu ein Ad2⁺D2-Hybridvirusstock hergestellt.

Hierzu wurden 80-90% konfluente TC7-Zellen auf 140mm Gewebekulturschalen mit 2 ml einer verdünnten Viruslösung (Verdünnung 1:50 mit PBS) infiziert. Nach 90 Minuten Adsorptionszeit wurden 18 ml Medium zugegeben und die Platten bei 37°C inkubiert, bis sich 70-80% der Zellen von der Platte gelöst hatten, in der Regel nach 3-6 Tagen. Das Medium und die abgelösten Zellen wurden in ein Plastikröhrchen überführt und 3 mal eingefroren und wieder aufgetaut. Der Virustiter beträgt in der Regel 10^8 - 10^9 /ml (Ad2-Titer), ca. 1/3 Hybridvirus und 2/3 Adeno2-Helfervirus (E. Baumann, pers. Mitteilung).

PBS: für 1 Liter: 8,76 g NaCl
 0,37 g KCl
 0,275 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 4,513 g Na_2HPO_4
 pH 7,35

3.3. Infektion von TC7-Zellen

Subkonfluente TC7-Zellen (ca. 1×10^7 Zellen pro 140 mm Gewebekulturschale) wurden mit 5-10 PfU/Platte SV40-Wt-Virus oder mutiertem Virus (s. 3.2.) in 2 ml Medium infiziert. Nach 2 Stunden bei 37°C wurde wieder auf die normale Menge Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden nach ungefähr 40 Stunden zur Zellextraktgewinnung verwendet.

3.4. Herstellung von T-Antigen enthaltendem Zellextrakt

Infizierte (TC7) oder transformierte Zellen wurden 3 mal mit isotonischem Hanks-Puffer (Hanks, 1949) gewaschen und in 1 ml Puffer von der Gewebekulturschale abgeschabt. Sodann

wurden die Zellen in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert und in 100 μ l Lysis-Puffer/Platte (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM NaCl, 0,5 % Nonidet P-40) resuspendiert (Smith et al., 1978). Nach 30 Minuten Inkubation bei 0°C wurde das Chromatin pelletiert und der überstehende Cytoplasma-Kern-Extrakt für T-Antigen-Bindungsexperimente verwendet.

Hanks-Puffer: für 1 Liter:
 80,0 g NaCl
 4,0 g KCl
 1,0 g $MgCl_2$
 1,0 g $MgSO_4$
 1,4 g $CaCl_2$
 0,6 g Na_2HPO_4
 10,0 g Glucose

3.5. Sedimentationsanalyse von Cytoplasma-Kern-Extrakten

Die Extrakte zweier infizierter TC7-Platten wurden in einem Volumen von 200 μ l Lysispuffer auf einen 5-20%igen Sucrose-Gradienten (10 mM Hepes, pH 7,8, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,5 mM $MgCl_2$, 150 mM KCl und 5 bzw. 20 % Sucrose) mit einem 200 μ l großen 60 %igen Sucrosekissen aufgetragen. Dann wurde 21 Stunden bei 0°C und 45000 rpm in einem Beckmann SW 55 Ti-Rotor zentrifugiert. Der Gradient wurde in Fraktionen zu 4 Tropfen, entsprechend ca. 100 μ l ausgetropft. Zur Sedimentationsgeschwindigkeitsbestimmung wurden drei Marker, deren Sedimentationskoeffizienten bekannt sind, unter gleichen Bedingungen behandelt.

a) Hämoglobin: einige Milligramm Hämoglobin wurden zu den 200 μ l Markerlösung in Puffer A (10 mM Hepes, pH 7,8, 5 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mM $MgCl_2$, 1 mM PMSF) gegeben. Die braune Farbe des Hämoglobins, welches mit 4,3 S sedimentiert, ist in den Fraktionen leicht erkennbar.

b) β -Galaktosidase: 0,4 μ l β -Galaktosidase-Lösung (Sedimentationskoeffizient 16S) wurden ebenfalls zur Markerlösung in Puffer A gegeben.

Zum β -Galaktosidase-Test wurde zu den Proben, wo man β -Galaktosidase erwartete, 1 ml Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,0) zugegeben, auf 28°C equilibriert und dann mit 0,2 ml o-Nitrophenyl- β -galaktosid-Lösung (5mg/ml) bei 28°C inkubiert. Nach 10 Minuten, bei auftretender Gelbfärbung der Proben, wurde mit 0,5 ml 1 M Na_2CO_3 -Lösung die enzymatische Reaktion gestoppt und die Absorption der Probenlösungen bei 420 nm im Spektralphotometer bestimmt.

c) Alkalische Phosphatase: der Markerlösung wurde 1 μ l der 1:100 verdünnten Alkalischen Phosphatase zugegeben. Nach dem Tropfen der Fraktionen wurde dann auf folgende Weise die Lokalisation der mit 6 S sedimentierenden Alkalischen Phosphatase bestimmt: zu 2 g Triethanolamin wurden 4 p-Nitrophenylphosphat-Tabletten zugegeben und alles in 20 ml Wasser gelöst. Zu 200 μ l dieser Lösung wurden 25 μ l der getropften Fraktionen der Markerlösung pipettiert und ca. 30 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μ l 4 N NaOH gestoppt und die Absorption der Proben bei 400 nm im Spektralphotometer gemessen.

Die Peakfraktionen der Marker wurden mit den jeweiligen Sedimentationskoeffizienten korreliert, daraus auf die Position der verschiedenen T-Antigen-Formen (5S, 7S, 14S) im Gradienten geschlossen und die entsprechenden Fraktionen vereinigt.

3.6. Isolierung von Plasmid-DNA

3.6.1. Alkalischer Schnellaufschluß

Diese Isolierung wurde in Anlehnung an die Alkalische Lysis Methode, beschrieben in Maniatis, 1982, S. 368, jedoch mit

Veränderung der Mengen und Inkubationszeiten (nach A. Arthur, pers. Mitteilung) durchgeführt.

Zu 25 ml LB-Medium wurden 500 µl Ampicillin-Stammlösung (50 mg/ml) gegeben und dann mit einer Einzelkolonie der, auf einer Ampicillin-haltigen LB-Platte gezogenen, Plasmid enthaltenden E.coli-Bakterien angeimpft. Man ließ die Bakterien unter starkem Schütteln bei 37°C über Nacht wachsen, zentrifugierte dann bei 10000 rpm im SS34-Rotor einer Sorvall-Zentrifuge ab, verwarf das Medium und löste das zurückgebliebene Bakterienpellet in 1 ml lysierendem Puffer (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 4 mg/ml Lysozym). Nach einer Stunde Inkubation bei 0°C wurden 2 ml einer frischen Lösung aus 0,2 N NaOH und 1% SDS zugegeben und nochmals 1 Stunde bei 0°C inkubiert. Danach wurden 1,5 ml einer Lösung zugegeben, welche wie folgt bereitete wurde: Zu 60 ml 5 M Kaliumacetat gibt man 11,5 ml Eisessig und 28,5 ml steriles Wasser. Man erhält eine Lösung, welche 3 M bezogen auf Kalium und 5 M bezogen auf Acetat ist. Nach Mischen und Inkubation von 15 Minuten bei 0°C wurde 15 Minuten bei 10000 rpm und 4°C im gleichen Rotor abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Corex-Röhrchen überführt. Sodann wurde das gleiche Volumen (4 ml) Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1 zugegeben, gemischt und 1/2 Stunde bei 0°C inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Entfernen des Phenol/Chloroform-Gemischs durch Abnehmen des DNA-haltigen Überstands in ein neues Röhrchen wurde das doppelte Volumen Ethanol zugegeben. Nach Mischen und kurzem Stehen bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert und mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 400 µl 0,3 M Natriumacetatlösung, pH 4,8, welche 20 µl DNase freie RNase (10mg/ml) enthielt, resuspendiert, die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt und dann die DNA mit 1 ml 96%igem Ethanol gefällt. Das DNA Pellet wurde getrocknet und in 50 ml TE-Puffer aufgenommen. Die Reinheit wurde durch

Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Man erhielt auf diese Weise Ausbeuten von ungefähr 100 - 150 μ g DNA.

3.6.2. Plasmidisolierung über Dichtegradientenzentrifugation

Mit 500 μ l einer 5 ml Übernachtskultur einer Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstamms in LB-Medium und 100 μ g/ml Ampicillin wurde eine zweite Kultur in 250 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 μ g/ml) angeimpft. Diese wurde 15-20 Stunden bei 37°C geschüttelt. Um die Zellen abzutöten wurden nach Beendigung der Wachstumszeit 250 μ l Chloroform zugegeben, geschüttelt und die Lösung über dem Chloroform in Zentrifugenbecher abdekantiert. Es wurde 10 Minuten bei 4°C und 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 3.75 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 25% Sucrose resuspendiert, 625 μ l Lysozym (20 mg/ml) zugegeben und unter gelegentlichem Schütteln für 5 Minuten auf Eis stehen gelassen. Nach Zugabe von 625 μ l 0,5 M EDTA, pH 8,0, wurde nochmals fünf Minuten auf Eis stehen gelassen. Dann wurden 6,25 ml einer Detergenslösung (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 62,5 mM EDTA, 0,2% Triton X-100) langsam zugegeben und nach 15 Minuten Stehen auf Eis gut homogenisiert. Es wurde bei 15000 rpm und 4°C zwei Stunden zentrifugiert und im Überstand die DNA-Formen I und II nach Vinograd et al., 1963, im Caesiumchlorid-Ethidiumbromid-Gradienten aufgetrennt. Nach Dialyse gegen zuerst TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) mit 1 M NaCl, dann nur gegen TE-Puffer und anschließender Ethanolfällung wurde der DNA-Gehalt am Spektralphotometer bestimmt und die DNA in TE bei 4°C aufbewahrt.

LB-Medium flüssig: für 2 Liter:

20 g Trypton

10 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

pH 7,6 - 7,8

LB-Platten: für 1 Liter:
 10 g Trypton
 10 g Hefe-Extrakt
 5 g NaCl
 15 g Agar
 pH 7,6 - 7,8
 50 ug/ml Ampicillin

3.7. Spaltung von Plasmid DNA mit der Restriktionsendonuklease HindIII

Zur Spaltung mit der Restriktionsendonuklease HindIII wurden 5 ug DNA mit 10 ul 10-fach konzentriertem Puffer (6 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-Mercaptoethanol, 0,05% Triton) versetzt, 2-4 Units Enzym pro ug DNA zugegeben und dann 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einer Ethanol-fällung wurde die geschnittene DNA im gewünschten Volumen TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen und entsprechend weiterverwendet (Markierung mit ³²P und Immunpräzipitation).

3.8. Agarose-Gel-Elektrophorese

0,8 und 2%ige horizontale Agarosegele wurden in TEB-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM Borsäure, 2 mM EDTA) zubereitet und ebenfalls in diesem Puffer elektrophoretisiert. Die Gele hatten eine Größe von 20 x 15 cm, die Stromstärke betrug bei 15 Stunden Laufzeit ca. 40 mA. Als Farbmarker wurde der DNA-Lösung 5-10% 20%ige Sucrose in TE mit 1% Bromphenolblau zugegeben.

Für einige Experimente wurden Agarose-Minigele (Fa. Hoefer Scientific, San Francisco) zur Auftrennung von DNA-Fragmenten benutzt. Die Größe der Gele betrug 10 x 7 cm, Elektrophorese von 2%igen Minigelen wurde ca. 60 Minuten bei 80 mA im obengenannten Puffer durchgeführt.

3.9. Radioaktive Markierung der 5'-Enden von DNA nach Restriktionsschnitt

3.9.1. Dephosphorylierung

Um die geschnittene DNA an den, durch den Restriktionsschnitt mit dem Enzym HindIII entstandenen, überhängenden 5'-Enden mit radioaktivem Phosphat markieren zu können, mußten zuerst die nach der Restriktionsverdauung noch vorhandenen 5'-Phosphatgruppen entfernt werden. Dies geschah mit dem Enzym Alkalische Phosphatase.

Diese wurde folgendermaßen vorbereitet: 10 µl = 40 Units Enzym wurden eine Minute lang in der Eppendorf-Zentrifuge pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 0,5 ml Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂ aufgenommen und zwei Stunden gegen denselben Puffer dialysiert. Die sich ergebende Enzymkonzentration war 80 U/ml. Die so vorbereitete Alkalische Phosphatase wurde bei 4°C aufbewahrt.

Die zu behandelnde DNA (ca. 5 µg) lag in 50 µl TE vor. Dazu wurden 5 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 µl 100 mM ZnCl₂, 0,5 µl 1M MgCl₂ und 10 µl vorbehandelte Alkalische Phosphatase (= 0,8 U) zugegeben. Es wurde eine Stunde bei 37°C, dann 10 Minuten lang bei 65°C inkubiert und nachfolgend durch Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0, die Reaktion abgestoppt. Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform und Ether wurde eine Ethanolfällung durchgeführt, das Pellet zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5 µl TE aufgenommen.

3.9.2 5'-Endmarkierung der dephosphorylierten DNA

Die Auffüllung der 5'-Enden der DNA mit radioaktivem Phosphat wird mit Hilfe des Enzyms T4-Polynukleotidkinase ausgeführt.

Zum Pellet der Phosphatase-Reaktion, welches in 5 µl TE gelöst vorlag, wurden 35 µl 20 mM Tris-HCl, pH 9,5, 1 mM

Spermidin, 0,05 mM EDTA zugegeben, 5 Minuten auf 60°C erhitzt, abgekühlt und mit 5 µl Tris-HCl, pH 9,5, 110 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 50% Glycerol versetzt, gut gemischt, dann mit 2 µl (=4U) Polynukleotidkinase und 10 µl γ -³²P-ATP (3000 Ci/mmol) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einer Ethanolfällung und zweimaligem Waschen mit 80%igem Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl TE aufgenommen.

3.10. Präparation der Staphylococcus aureus-Bakterien

Die Präparation der Staphylococcus aureus-Bakterien wurde von Frau U. Markau und Frl. S. Dehde nach Kessler, 1975, durchgeführt und die Bakterien in 1 ml-Portionen bei -20°C aufbewahrt. Die Bakterien wurden vor der Verwendung abzentrifugiert und in 0,9 ml NET (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 % Nonidet P-40) aufgenommen, 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend mindestens fünfmal mit NET gewaschen und schließlich in NET aufgenommen und gut suspendiert.

3.11. Reinigung der monoklonalen Antikörper

Dicht gewachsene Hybridomzellen wurden solange unter Zellkulturbedingungen stehen gelassen, bis der Großteil abgestorben war, dann die aufgelösten Zellfragmente abzentrifugiert und zu 250-500 ml Zellüberstand, welcher die monoklonalen Antikörper enthielt, 0,02 % Natriumazid und 1 g in NET-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) gequollene Protein A-Sepharose gegeben. Damit das an Sepharose gekoppelte Protein A optimal an die in der Lösung enthaltenen Antikörpern binden konnte, wurde durch leichtes Schütteln über Nacht bei Raumtemperatur ein Absinken der Sepharose verhindert, diese anschließend auf eine Säule gepackt und solange mit NET-Puffer gewaschen (ca. 20-faches Säulenvolumen) bis die Extinktion des Eluates bei 280 nm

gleich null war. Die Elution der monoklonalen Antikörper erfolgte mit 0,25 M Glycin-HCl-Puffer, pH 2,4. Fraktionen von 0,5-1 ml Volumen wurden gesammelt, die Extinktion bei 280 und 260 nm am Spektralphotometer bestimmt und die Proben anschließend sofort mit Tris-Pulver neutralisiert. Die Proben, welche IgG enthielten, wurden gegen Borat-Puffer (0,1 M Borsäure, 0,03 M Natriumtetraborat, 0,1 M NaCl) dialysiert, dann nochmals die Extinktion der vereinigten dialysierten Proben bestimmt und der Proteingehalt auf ca. 1-2 mg Protein pro ml eingestellt. Die Antikörper wurden bei -20 oder -70°C aufgehoben.

Zur Regeneration des Säulenmaterials wurde mit 10-fachem Säulenvolumen von zuerst 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 0,5 M NaCl, dann von 0,1 M Natriumacetat, pH 4,5, 0,5 M NaCl und zum Schluß mit NET-Puffer gewaschen.

3.12. Immunpräzipitation von SV40 DNA

Die Immunpräzipitation von SV40 DNA wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (C. Burger, pers. Mitteilung, Huber et al., 1985, Hinzpeter et al., 1986):

T-Antigen-haltige Extrakte verschiedener Zelllinien oder Monomer-, Dimer- oder Tetramerfraktionen aus dem Sucrosegradienten wurden in Proben zu 100 µl unter Zugabe von 100 µl Puffer A (10 mM Hepes, pH 7,8, 5 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF) mit 5 µg gereinigtem monoklonalen Antikörper (wenn bei den Experimenten nicht anders angegeben, mit Pab 108) und 30 µl Staphylococcus aureus-Suspension (s.3.10.) immungefällt und damit von anderen zellulären Proteinen abgetrennt (Fanning et al., 1982). Die T-Antigen-Menge betrug in den Proben ca. 100 ng. Dies wurde für Zellrohextrakte durch Laemmli-Gelelektrophorese (s.3.14.) im Vergleich mit bekannten Mengen Rinderserumalbumin festgestellt. Für Mono-, Di- und Tetramerfraktionen wurden die Mengen von T-Antigen

durch Dot Blot mit denen von Zellrohextrakt verglichen (R. Runzler, pers. Mitteilung).

Die Immunkomplexe wurden dreimal mit NET (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 % Nonidet P-40) gewaschen, dann in 100-150 μ l Puffer A mit 80 mM KCl aufgenommen und 0,2 mg/ml Glycogen, sowie 1 mg/ml Rinderserumalbumin zugegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation wurde, wie in Ergebnisse genannt, Nukleotid, oder Puffer A (80 mM KCl) in den Kontrollproben, zugegeben, und nochmals 1/2 Stunde bei 0°C inkubiert, bevor 0,25 μ g (ein Überschuß gegenüber T-Antigen) HindIII geschnittene, 5'-endmarkierte Plasmid-DNA, pSV-Wt oder p1097, für 2h zugegeben wurde. Nach erneutem Waschen mit NET wurde gebundene DNA durch Zugabe von Laemmli-sample-Puffer (0,125 M Tris-HCl, pH 8,3, 20% Glycerin, 4% SDS, 10% 2-Mercaptoethanol, 0,001% Bromphenolblau) und Erhitzen auf 60°C vom Immunkomplex gelöst und auf ein 2%iges Agarosegel (s.3.8.) aufgetragen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese getrocknet und eine Autoradiographie auf Kodak X-Omat S-Film angefertigt.

3.13. Markierung des T-Antigens an der ox-ATP-Affinitätsmarkierungsstelle

Diese Methode wurde in Anlehnung an die von Clertant und Cuzin, 1982, beschriebene verwendet. Die beschriebene ox-ATP-Bindungsstelle (Clertant und Cuzin, 1982; Clertant et al., 1984) wird hierbei mit radioaktivem α -³²P-ATP, welches an der Riboseeinheit zum Dialdehyd oxidiert wurde, besetzt, und das ox-ATP dann durch Zugabe von reduzierendem Natriumcyanoborhydrid kovalent an das T-Antigen gebunden. Ebenfalls getestet wurde, ob diese Bindungsstelle auch mit oxidiertem GTP und UTP belegbar ist.

3.13.1 Oxidation von α - ^{32}P -ATP, α - ^{32}P -GTP und α - ^{32}P -UTP

Zu jeweils 10 μl der radioaktiven Nukleotide (3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) wurden 10 μl 20 mM Natriummetaperjodat gegeben und 90 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden dann 4 μl 50% Glycerin zugegeben und mit Puffer A (10 mM Hepes, pH 7,8, 5 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF) auf 200 μl aufgefüllt.

3.13.2. Reaktion mit T-Antigen

Zu 100 μl T-Antigen-enthaltendem Zelleextrakt (s.3.4.) oder Sucrosegradientenfraktion (s.3.5.) wurden 20 μl oxidiertes α - ^{32}P -ATP, α - ^{32}P -GTP oder α - ^{32}P -UTP und 10 μl 100 mM NaCNBH_3 zugegeben, dann die Lösung 5 mM an MgCl_2 gemacht und über Nacht bei 0°C inkubiert. Nach Zugabe von 5 μg monoklonalem Antikörper Pab 108 wurde 1 h bei 0°C inkubiert, dann 30 μl Staphylococcus aureus-Suspension zugegeben und einmal mit NET (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% Nonidet P-40), zweimal mit NET, 0,5 M LiCl enthaltend, und zuletzt noch einmal mit NET gewaschen. Nach Lösen des Immunkomplexes durch Zugabe von 20 μl Laemmli-sample-Puffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% Glycerol, 2% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol, 0,001% Bromphenolblau) und fünfminütiges Kochen wurden die Proben auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel (s.3.14) mit 5%igem Sammelgel aufgetragen und elektrophoretisiert.

3.14. Laemmli-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Proteine werden am günstigsten in Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

Aus 10 ml Lösung A (30% Acrylamid, 0,8% N,N'-bis-methyl-acrylamid), 12,5 ml Lösung B (1,5 M

Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS), 15,5 ml destilliertem Wasser, 480 μ l 10% Ammoniumperoxodisulfat und 24 μ l

N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin wurde ein 12,5%iges Polyacrylamid-Trenngel mit der Länge 9 cm, Breite 14 cm und der Dicke 1,5 mm gegossen. Darüber wurden 2 cm 5%-iges Sammelgel gegossen: Zu 1,65 ml Lösung A wurden 2,5 ml Lösung C (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4% SDS), 5,85 ml H₂O, 50 μ l Ammoniumperoxodisulfat und 10 μ l

N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin pipettiert. Für den Gellaufpuffer wurden 9,1 g Tris, 43,2 g Glycin und 3,0 g SDS mit destilliertem Wasser auf 3 Liter aufgefüllt und der pH auf 8,3 eingestellt. Die Gele wurden 3 h bei 40 mA elektrophoretisiert und da als Marker eine nicht-radioaktive Proteinlösung bekannter Massen benutzt wurde, zuerst mit Coomassie Blau-Lösung angefärbt, dann mit Entfärbelösung (10% Eisessig, 40% Methanol, 50% Wasser) solange behandelt, bis nur noch die Proteinbanden blau gegenüber dem farblosen leeren Teil des Gels sichtbar waren. Die Gele wurden anschließend getrocknet und autoradiographiert.

3.15. ATPase-Reaktion

Diese Methode ist eine Variation derer von Clark et al., 1981, und wurde von Michele Manos, Cold Spring Harbor, entwickelt. Es wird hierbei ATP durch die ATPase-Aktivität des T-Antigens in ADP und anorganisches Phosphat gespalten.

3.15.1. Präparation des Zellextrakts

Zu diesem Experiment wurden die T-Antigen enthaltenden Zellextrakte anders als bisher üblich hergestellt. Von einer konfluenten COS1-Gewebekulturschale wurde das Medium entfernt und 5 ml Puffer I (10 mM MES, pH 6,2, 10 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) für 5 Minuten zugegeben. Nach Entfernen des Puffers wurden 3 ml Puffer II (Puffer I + 0,1 % Nonidet P-40) zugegeben und wieder 3 Minuten stehen gelassen. Auch dieser Puffer wurde wieder entfernt und mit Puffer I

nachgewaschen, es verblieben nur noch Zellkerne und Zellmatrix auf der Schale. Nach Zugabe von 3 ml Extraktionspuffer, Puffer III (10 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM NaCl), wurde 45 Minuten bei 4°C inkubiert, anschließend die Zellen von der Platte geschabt und die 3 ml Zelllösung in zwei Eppendorfgefäße überführt. Es wurde 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand als T-Antigen-haltiger Kernextrakt weiterverwendet.

3.15.2. ATPase-Reaktion

Zu Proben von 0,4 ml Zelleextrakt wurden 2 µg gereinigter monoklonaler Antikörper Pab 108 zugegeben und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Sodann wurden 100 µl gequollene Protein A-Sepharose (10%-ige Suspension in Puffer III) zupipettiert und 2,5 h bei 4°C geschüttelt. Nach Pelletieren der Sepharose wurde der Überstand entfernt und das Pellet zuerst mit Puffer IV (1 M LiCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 0,5 % Nonidet P-40), dann mit Puffer V (25 mM Pipes, pH 7,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,01% Nonidet P-40) gewaschen. Nach Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes wurden 100 µl ATPase-Reaktionsmischung zugegeben: Puffer V wird 0,5 µM an r-ATP gemacht und dann pro 100 µl 10 uCi γ -³²P-ATP (bzw. γ -³²P-GTP oder γ -³⁵S-ATP γ S) zugesetzt. Diese Mischung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert und 80 µl Überstand zu 110 µl Norit-Aktivkohle (15% Aktivkohle in 50 mM HCl, 5 mM H₃PO₄) pipettiert. Nach 1-2 Minuten wurde erneut zentrifugiert und von 80 µl des Überstandes in 3 ml Ready Solv EP (Beckman) die vorhandene Radioaktivität im Scintillationszähler gemessen.

Der Leerwert wurde mit T-Antigen und Protein A-Sepharose, jedoch ohne spezifischen monoklonalen Antikörper bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Auswirkungen der Zugabe von Nukleotiden auf die T-Antigen-DNA-Bindung

4.1.1. Inhibition und Nukleotidspezifität

Als Quelle für T-Antigen wurde die Zelllinie COS1 verwendet, da diese Zellen permanent Wildtyp-T-Antigen exprimieren (Gluzman, 1981). T-Antigen wurde durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper immungefällt und damit von anderen im Zellextrakt vorhandenen Proteinen abgetrennt. Wenn nicht anders erwähnt, wurde der monoklonale Antikörper 108 (Gurney et al., 1986) für die Experimente verwendet, da gezeigt worden war, daß er mit gleicher Effektivität wie Hamsterantitumorserum an T-Antigen bindet (Huber et al., 1985). Er beeinträchtigt auch nicht die DNA-Bindung, was durch DNase-Footprinting-Experimente nachgewiesen worden war (Ryder et al., 1985). Nach Fällung dieses Komplexes durch das Antikörper-bindende Protein A der Bakterien *Staphylococcus aureus* und Entfernung ungebundener Zellkomponenten, wurden zu verschiedenen Proben bestimmte Nukleotide zugegeben, um deren Effekt auf die T-Antigen-DNA-Bindung zu untersuchen. Nach halbstündiger Inkubation mit Nukleotid wurden dann 5'-endmarkierte Restriktionsfragmente von klonierter SV40 Wildtyp DNA (pSV-Wt) im Überschuß zugegeben, welche die T-Antigen Bindungsstellen I und II im HindIII-C Fragment enthält. ATP, dATP, GTP und dGTP übten im Gegensatz zu CTP, dCTP, TTP, UTP und NAD⁺ einen sehr starken inhibierenden Effekt aus (Abb.4.1), wodurch auf eine Spezifität der Purine für die Inhibition der DNA-Bindung geschlossen wurde. Innerhalb der Purine wiederum, zeigte außer den Triphosphaten auch das Adenosindiphosphat (Abb.4.4, Spur 2) eine inhibitorische Wirkung, während das Monophosphat viel schwächer wirkte (Abb.4.4, Spur 3). Auch nicht spaltbare ATP-Analoga, wie AMP-PCP (Abb.4.8), AMP-PNP (Abb.4.4, Spur 5) und die

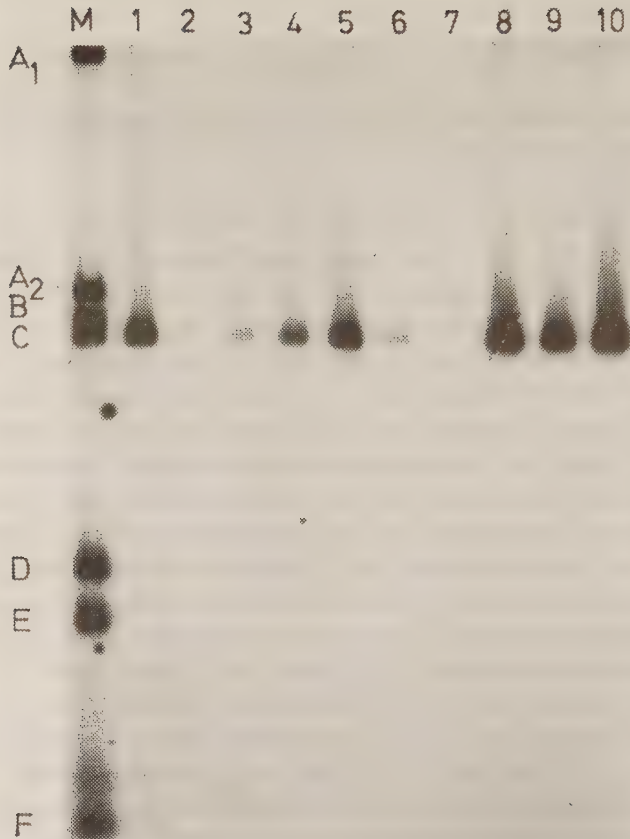


Abb. 4.1: Nukleotidspezifität der Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung

Durch Immunpräzipitation gereinigtes COS1-T-Antigen wurde auf Bindung an pSV-Wt-DNA-Fragmente, wie in Methoden (3.12.) beschrieben, untersucht. Es wurde dabei der Einfluß verschiedener Nukleotide, jeweils in einer Konzentration von 20 mM, auf die Bindung von T-Antigen an radioaktiv markierte pSV-WT-DNA-Fragmente erforscht. Spur 1: ohne Nukleotid, Spur 2: ATP, Spur 3: dATP, Spur 4: CTP, Spur 5: dCTP, Spur 6: GTP, Spur 7: dGTP, Spur 8: TTP, Spur 9: UTP, Spur 10: NAD⁺. Die Proben wurden auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen, nach Elektrophorese das Gel getrocknet und eine Autoradiographie hergestellt. Als Marker (M) wurden 12,5 ng der eingesetzten radioaktiv markierten HindIII-geschnittenen pSV-Wt-DNA aufgetragen.

Schwefelanaloga ATPBS und ATP γ S (Abb.4.2A) hatten mittlere bis starke inhibitorische Wirkung auf die T-Antigen-DNA-Bindung. Adenin dagegen zeigte keinerlei Wirkung (Abb.4.2A, Spur 3), cyclo-AMP einen leicht inhibierenden Effekt auf die DNA Bindung (Abb.4.2B). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß, bei gleicher Nukleotidkonzentration von 20 mM, Purinnukleosidtriphosphate und ATP γ S die stärkste Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung induzierten, während Pyrimidintriphosphate, NAD⁺, cAMP und Adenin die Bindung praktisch nicht beeinflussten.

4.1.2. Konzentrationsabhängigkeit und Einfluß auf die verschiedenen Bindungsstellen

Da eine Nukleotidkonzentration von 20 mM, wie in den vorigen Experimenten verwendet, sehr hoch ist - physiologische zelluläre ATP-Konzentrationen werden auf ca. 5 mM geschätzt (Akerboom et al., 1978; Rapaport et al., 1979) -, wurde die Abhängigkeit der Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung von der Nukleotidkonzentration untersucht. 50 % Inhibition der DNA-Bindung findet danach bereits bei Konzentrationen von 10 μ M ATP und bei den schwächeren Inhibitoren ADP und AMP-PNP bei 1-2 mM Nukleotid statt (Abb.4.3, Innenbild). Im Fall von ATP erreicht die DNA-Bindungsaktivität ein Minimum bei Konzentrationen zwischen 2 und 20 mM Nukleotid (Abb.4.3). Dieses Experiment wurde von Frau U.Markau in unserem Labor ausgeführt und von mir bestätigt.

Um in den folgenden Experimenten den maximalen inhibitorischen Effekt beobachten zu können, wurden sie, wenn nicht anders angegeben, mit 20 mM ATP, also einem Nukleotidüberschuß, durchgeführt.

Da die DNA-Bindung des T-Antigens bekanntlich an mehreren Bindungsstellen auf der viralen DNA im Bereich des Replikationsursprungs stattfindet (Tjian et al., 1978) und die Bindung an verschiedene Stellen auch für verschiedene dadurch induzierte Ereignisse verantwortlich ist - Bindung

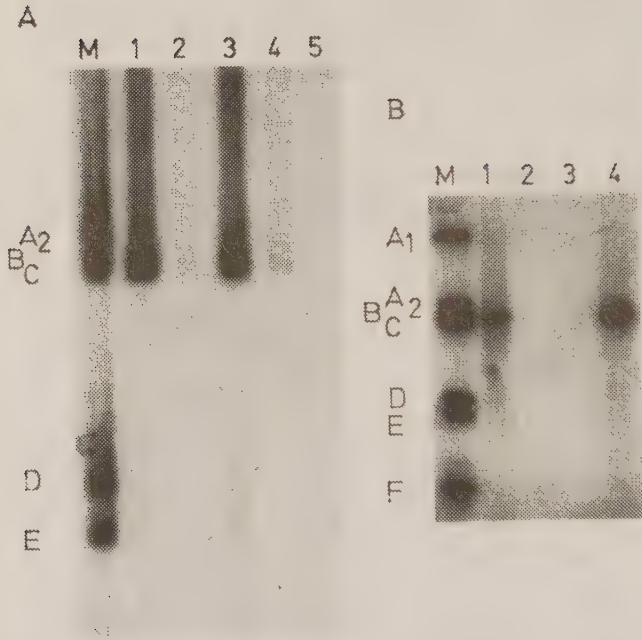


Abb. 4.2: Untersuchung der inhibierenden Wirkung verschiedener ATP-Analoga

A: Wie in Abb.4.1 vorgereinigt COS1-T-Antigen wurde mit 20 mM Konzentrationen von Nukleotiden auf Bindung an pSV-WT-DNA-Fragmente untersucht: Spur 1: ohne Nukleotid, Spur 2: ATP, Spur 3: Adenin, Spur 4: ATPBS, Spur 5: ATP γ S.

B: Dieselbe Untersuchung wurde unter Zugabe von jeweils 20 mM cAMP (Spur 1) und cAMP zusammen mit ATP (Spur 2) im Vergleich mit ATP (Spur 3) oder ohne Nukleotid (Spur 4) durchgeführt.

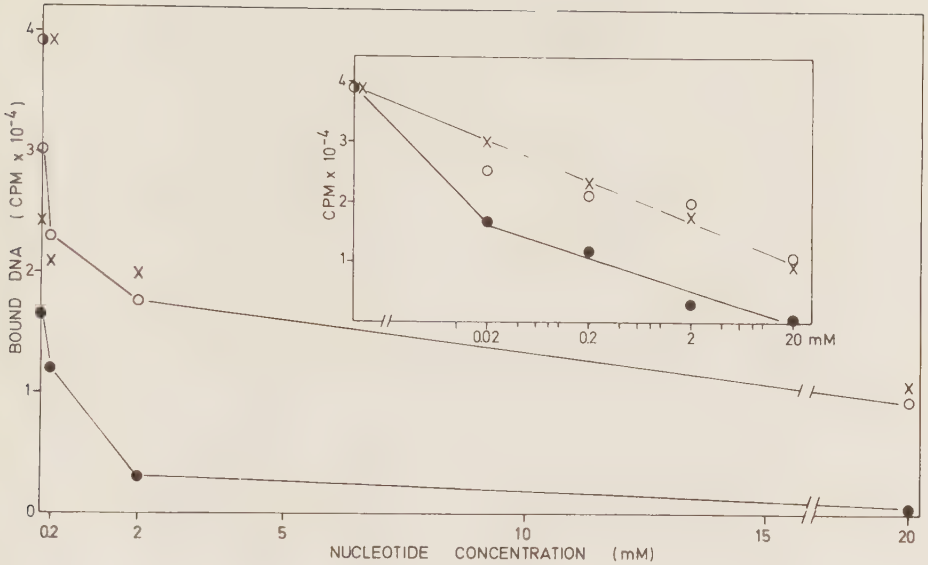


Abb. 4.3: Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung als Funktion der Nukleotidkonzentration

Immunpräzipitiertes COS1-T-Antigen wurde in Gegenwart von ATP (●), ADP (o) oder AMP-PNP (x) in den angegebenen Konzentrationen auf Bindung an pSV-Wt-DNA-Fragmente untersucht. Die Banden des gebundenen Hind III-C DNA-Fragments wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in Lumasolve/Lipoluma (Baker) die darin enthaltene Menge an Radioaktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers ermittelt.

Inneres Bild: Halblogarithmische Auftragung der gebundenen gezählten Radioaktivität (in cpm) als Funktion der Nukleotidkonzentration.

an Stelle I unter anderem für die Autoregulation (Rio et al., 1980; Hansen et al., 1981; DiMaio and Nathans, 1982), an Stelle II für die virale DNA Replikation (Shortle et al., 1979; DiMaio and Nathans, 1980; Margolskee and Nathans, 1984) - war es interessant zu untersuchen, ob die Bindung an beide Bindungsstellen durch Nukleotide beeinflusst wird. Hierzu wurde außer dem alle Bindungsstellen enthaltenden Plasmid pSV-Wt das Plasmid pl097 als DNA-Probe zur Bindung von T-Antigen benutzt. Dieses Plasmid enthält im SV40 "origin"-Bereich eine 31 Basenpaare umfassende Deletion, wodurch alle Teile der Bindungsstelle I entfernt sind (DiMaio and Nathans, 1982). Auch bei diesem Plasmid zeigte sich die Bindung an T-Antigen wie bei pSV-Wt mit ATP, ADP und AMP-PNP stark behindert, während AMP auch hier nur einen geringen Effekt hatte (Abb.4.4). Dies zeigt, daß nicht nur die etwa 10fach stärkere Bindung des T-Antigens an Bindungsstelle I (Jones and Tjian, 1984; Dixon and Nathans, 1985), sondern in gleicher Weise die Bindung an die Bindungsstelle II durch ATP und seine Analoga beeinflusst wird.

4.1.3. Untersuchungen zum Einfluß von Antikörpern auf die T-Antigen-DNA-Bindung und auf deren Inhibition durch ATP

Man könnte vermuten, daß Zugabe von Nukleotid den vorgeformten T-Antigen-Antikörper-Komplex zu lösen vermag und daher an T-Antigen gebundene DNA nur deshalb nicht mehr sichtbar wäre, da kein präzipitierbarer Immunkomplex von T-Antigen und Antikörper mehr vorhanden wäre.

Um dieser Möglichkeit nachzugehen, führte Andrea Schmid in unserem Labor folgenden Versuch durch: T-Antigen wurde mit monoklonalem Antikörper mit und ohne Zugabe von ATP in An- und Abwesenheit von kalter pSV-Wt DNA inkubiert. Nach Fällung mit Staphylococcus aureus und darauffolgendem Lösen des Komplexes wurde ein Polyacrylamidgel gefahren und davon ein Western-Blot hergestellt. Als Kontrolle wurde eine Probe

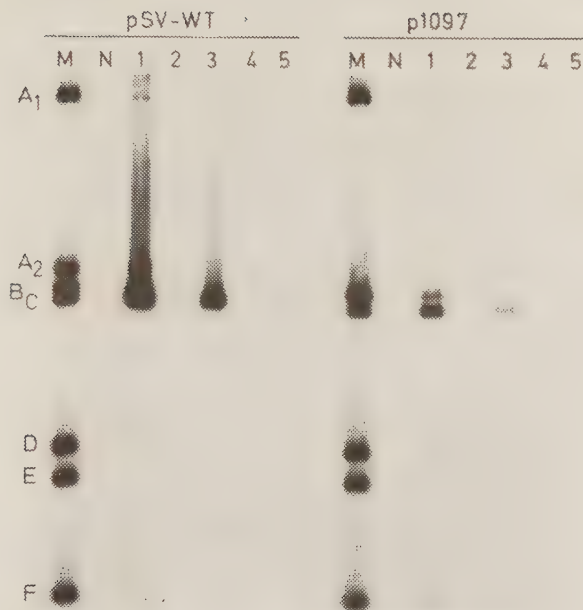


Abb. 4.4: Adenosinribonukleotide inhibieren die Bindung des T-Antigens sowohl an Bindungsstelle I als auch an Bindungsstelle II im SV 40 Replikationsursprung

Immungereinigtes COS1-T-Antigen wurde 30 Min. bei 0°C mit Spur 1: Puffer, Spur 2: 20 mM ADP, Spur 3: 20 mM AMP, Spur 4: 20 mM ATP oder Spur 5: AMP-PNP vorinkubiert. Die Proben wurden sodann auf spezifische Bindung an radioaktiv markierte pSV-Wt- oder p1097-DNA-Fragmente untersucht. Die pSV-Wt-HindIII-Restriktionsfragmente sind am linken Rand gekennzeichnet. Eine Kontrolle (N) wurde statt mit spezifischem monoklonalen Antikörper mit Mausimmunglobulin gefällt.

statt mit T-spezifischem Antikörper mit Mausimmunglobulin inkubiert. In Abb.4.5 sieht man deutlich, daß trotz ATP-Zugabe mit oder ohne pSV-DNA die T-Antigen-Bande auf dem Blot an der richtigen Stelle sichtbar ist, im Gegensatz zur Kontrolle mit unspezifischem IgG. Es gibt also keine ATP-verursachte Dissoziation des Immunkomplexes, die vorhandene DNA-Bindung nicht mehr erkennbar werden ließe. Ebenfalls kann eine Degradation des T-Antigens unter Einwirkung von ATP ausgeschlossen werden. Vielmehr muß das T-Antigenmolekül selbst durch Nukleotide dahingehend beeinflusst werden, die normale DNA-Bindung nicht mehr durchzuführen.

Um auszuschließen, daß der hier beobachtete inhibitorische Effekt auf einer besonderen Eigenschaft des verwendeten monoklonalen Antikörpers Pab 108 beruht, wurde die Immunfällung in einem Experiment mit mehreren verschiedenen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Diese Antikörper binden an unterschiedliche Domänen des T-Antigen-Moleküls (Abb.4.6A). So binden die Antikörper Pab 108 und Pab 419 an den Aminoterminus (Harlow et al., 1981; W. Deppert, pers. Mitteilung), Pab 204, 205, 1630, 402 und 416 an Determinanten im mittleren Teil des Proteins und 405 und 419 an den carboxyterminalen Bereich des T-Antigens (Clark et al., 1981; Harlow et al., 1981; Ball et al., 1984). Das Ergebnis des Versuchs zeigte, daß, obwohl die verschiedenen T-Antigen-Antikörperkomplexe unterschiedliche DNA-Mengen präzipitierten, Zugabe von 20 mM ATP die DNA-Bindung in allen Fällen nahezu völlig verhinderte (Abb.4.6B).

Außerdem wurde ein Experiment durchgeführt, in welchem, Pab 108 jeweils zusammen mit einem der Antikörper 1630, 402, 405, 416 und 419 zur Präzipitation verwendet wurde. Dies sollte zeigen, ob sich zwei Antikörper, welche an T-Antigen binden, gegenseitig behindern oder den die DNA-Bindung inhibierenden Effekt beeinträchtigen. Es war jedoch deutlich erkennbar, daß die DNA-Bindung in allen Fällen ohne

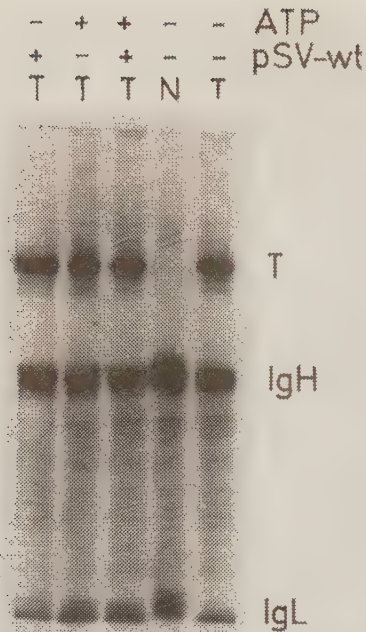


Abb. 4.5: T-Antigen dissoziiert unter Zugabe von ATP nicht vom vorgeformten Komplex aus monoklonalen Antikörper und T-Antigen

COS1-T-Antigen wurde über den Antikörper Pab 108 (T) oder Mausimmunglobulin (N) vorgereinigt. Pab 108-T-Antigen Komplexe wurden 30 Min. in Bindungspuffer mit (+) oder ohne (-) 20 mM ATP inkubiert. Sodann wurden HindIII geschnittene pSV-Wt-DNA-Fragmente, wie angezeigt (+), zugegeben und eine Stunde lang auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Immunkomplexe dissoziiert und über SDS-Polysacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970) und Western blotting (Towbin et al., 1979) analysiert. Der erste Antikörper war hierbei Pab 108 (1,7 µg/ml), der zweite Antikörper Biotin-markiertes Mausimmunglobulin (1:500, Amersham), gefolgt von Zugabe eines Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplexes (1:400, Amersham). Der Blot wurde mit 0,5 µg/ml Diaminobenzidin, 0,02 % H₂O₂, 0,03 % NiCl₂ 20 Minuten lang entwickelt (Adams, 1981). Die Banden von T-Antigen und der schweren (IgH) und leichten (IgL) Ketten der Iimmunglobuline sind am rechten Bildrand gekennzeichnet.

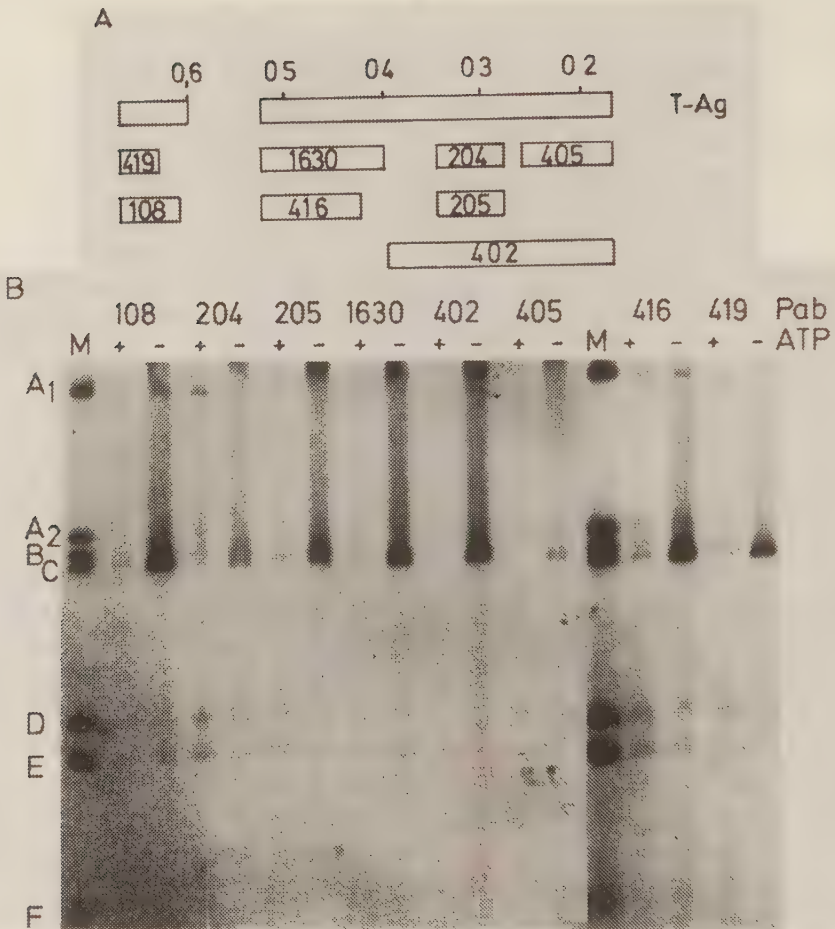


Abb. 4.6: ATP-Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens unter Verwendung von acht verschiedenen Antikörpern

A: Schematische Darstellung der Epitope auf dem T-Antigen-Molekül, an welche die verschiedenen monoklonalen Antikörper binden.

B: Jeweils 2 Proben COS1-T-Antigen wurden mit einem der acht monoklonalen Antikörper (wie angegeben) immungefallt. Eine der beiden Proben wurde vor DNA-Zugabe 30 Min. lang mit 20 mM ATP inkubiert (+), die andere Probe erhielt dasselbe Volumen Puffer (-). Die Bindung des T-Antigens an endmarkierte pSV-Wt-DNA-Fragmente wurde wie in Methoden (3.12) beschrieben untersucht.

Nukleotid im üblichen Bereich lag und daß mit Nukleotid, bei allen getesteten Kombinationen, T-Antigen kaum DNA binden konnte (Abb.4.7).

Auch wenn sich der Einfluß von ATP auf die DNA-Bindung des T-Antigens mit den verschiedenen Antikörpern nicht änderte, war noch die Möglichkeit offen, daß ATP nur unter den gegebenen experimentellen Bedingungen, nämlich, daß das T-Antigen bereits vor Zugabe von ATP und DNA an einen Antikörper gekoppelt war, inhibierend auf die DNA-Bindung des T-Antigens wirken kann. Diese Bedingungen könnten eine Beeinflussung des gesamten Moleküls, seiner Beweglichkeit oder Zugänglichkeit von Domänen bedeuten, auch wenn der Antikörper nur an eine bestimmte Stelle gebunden ist und somit nur mit einem kleinen Teil des Moleküls in direkte Wechselwirkung tritt. Deshalb mußte untersucht werden, ob der inhibierende Effekt des ATP das T-Antigen-Molekül selbst, oder nur die Kombination T-Antigen-Antikörper betrifft. Dazu wurde ein Versuch durchgeführt, in dem T-Antigen-haltiger Zellextrakt zuerst mit ATP, ADP und zwei nichtspaltbaren ATP-Analoga, AMP-PCP und AMP-PNP, sowie mit ATPBS und ATP γ S inkubiert wurde, dann die DNA und danach erst Antikörper und Staphylococcus aureus zugegeben wurde. Auch unter diesen Bedingungen ist die Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens aber in gleicher Stärke vorhanden (Abb.4.8).

Alle bisherigen Experimente deuten klar darauf hin, daß die Zugabe von Purinnukleosidtriphosphaten, bzw.-diphosphaten und deren unspaltbarer oder schwefelhaltiger Analoga das T-Antigen daran hindern, an virale "origin"-DNA zu binden.

4.1.4. Untersuchung möglicher Wirkungsweisen der ATP-induzierten DNA-Bindungsinhibition

Um zu untersuchen, ob die Nukleotid-induzierte Inhibition der DNA Bindung des T-Antigens von den Konzentrationen des

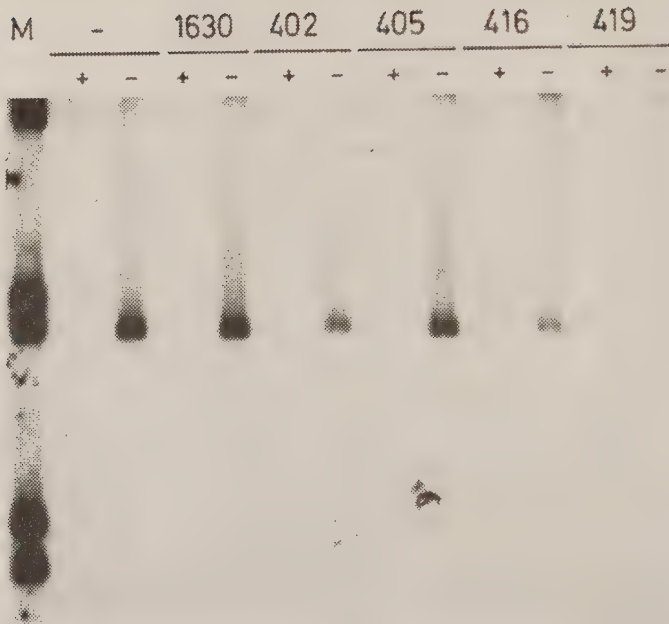


Abb. 4.7: Einfluß eines zweiten monoklonalen Antikörpers auf die ATP-induzierte Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens

Zusätzlich zum monoklonalen Antikörper 108 wurden zur Immunpräzipitation gleichzeitig die Antikörper 1630, 402, 405, 416 und 419 wie angegeben verwendet. Die ersten beiden Proben enthielten nur den Antikörper 108. Nach Waschen der Immunkomplexe wurde die Bindung an pSV-Wt-DNA-Fragmente mit (+) oder ohne (-) vorherige Inkubation mit 20 mM ATP untersucht.

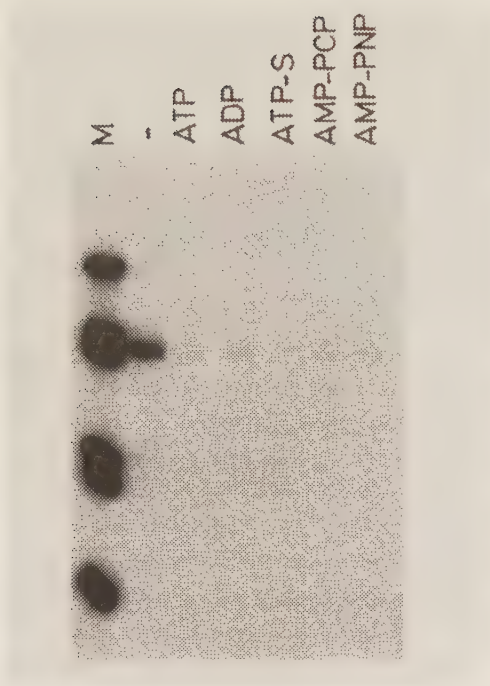


Abb. 4.8: ATP inhibiert SV40-DNA-Bindung von T-Antigen auch im Zellrohextrakt

Rohextrakt von COS1-Zellen wurde auf 25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 75 mM NaCl, 0,2 mg/ml Glycogen, 1mg/ml Rinderserumalbumin, 0,25% Nonidet P-40 eingestellt und ohne (-) oder mit 10 mM Nukleotid (+), wie angegeben, 30 Min. bei 0°C inkubiert. Endmarkierte pSV-Wt-DNA-Fragmente wurden anschließend zugegeben und damit nochmals 1 Stunde inkubiert. DNA-T-Antigen Komplexe wurden mit Pab 108 und fixierten Staphylococcus aureus-Bakterien immungefällt und durch Agarosegelelektrophorese und Autoradiographie analysiert.

T-Antigens oder der DNA in der Probe abhängig ist, wurde im Vergleich zu den anderen Experimenten (30 ug/ml markierte pSV-WT DNA Fragmente, 660 ng/ml T-Antigen) durch Variation des Probenvolumens die DNA-Konzentration auf 10 ug/ml herabgesetzt, sowie die T-Antigen-Konzentrationen variiert (200 ng/ml und 4 ug/ml). Es wurde jeweils die DNA-Bindung mit und ohne Vorinkubation mit 20 mM ATP untersucht. Innerhalb dieser Grenzen konnte jedoch keine Veränderung des inhibitorischen Effekts von ATP bemerkt werden (Daten nicht gezeigt).

Um weiterhin festzustellen, ob die Nukleotid-induzierte DNA-Bindungsinhibition des T-Antigens nur bei der experimentell benutzten Temperatur 0°C, bei der z.B. keine oder nur sehr wenig ATPase-Aktivität vorhanden ist, oder auch bei physiologischer Temperatur zu beobachten ist, wurde das DNA-Bindungsexperiment im Vergleich zu 0°C auch bei 20°C und 37°C durchgeführt. Da das T-Antigen in vitro bei 20°C und 37°C nicht 3 Stunden lang funktionsfähig bleibt, wurde bei 20°C 1 Stunde und bei 37°C nur eine halbe Stunde mit DNA inkubiert (Abb.4.9C). Auf den Effekt der ATP-Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung hatte die Temperaturänderung jedoch unter diesen Bedingungen keinen Einfluß.

Da das SV40 T-Antigen in vivo nach Translation durch Phosphorylierung an verschiedenen Stellen (Scheidtmann et al., 1982; Van Roy et al., 1983), durch Adenylylierung (Bradley et al., 1984) und ADP-Ribosylierung (Goldmann et al., 1981) modifiziert wird, wurde der Frage nachgegangen, ob die Nukleotid-induzierte Inhibition der DNA-Bindung ebenfalls auf einer solchen kovalenten Modifikation beruhen könnte. Da die bisherigen Experimente mit Gesamtzellextrakt durchgeführt wurden, wurde zuerst die Möglichkeit einer im Zellextrakt vorhandenen, an T-Antigen assoziierten, aber eigenständigen Enzymaktivität, wie z.B. einer Kinase untersucht, die unter Einwirkung von ATP das T-Antigen modifizieren und damit die Bindung an DNA verhindern könnte.

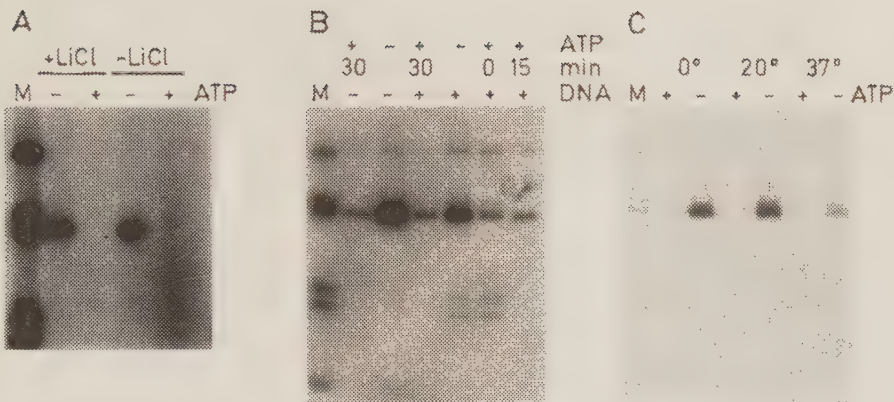


Abb. 4.9: Untersuchung verschiedener Bedingungen zur ATP-Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung

A: COS1-T-Antigen, welches durch Immunfällung vorgereinigt worden war, wurde mit NET-Puffer, der 0,5 M LiCl enthielt, bzw. mit NET-Puffer gewaschen und dann in An-(+) oder Abwesenheit (-) von 20 mM ATP auf Bindung an markierte pSV-Wt-DNA-Fragmente untersucht.

B: Immungereinigtes COS1-T-Antigen wurde mit (+) oder ohne (-) Zugabe von 20 mM ATP für 30, 15 oder 0 Minuten vor Zugabe von pSV-Wt-DNA-Fragmenten mit ATP inkubiert. Die Proben, welche mit + DNA gekennzeichnet sind, enthielten außerdem noch 50 µg/ml unmarkierte beschallte E.coli-DNA.

C: Immungereinigtes COS1-T-Antigen wurde mit (+) oder ohne (-) Zugabe von 20 mM ATP bei den genannten Temperaturen vor Zugabe von radioaktiv markierten pSV-Wt-DNA-Fragmenten inkubiert, gebundene DNA wurde nach 2h (0°C), 1h (20°C) oder 30 Min. (37°C) analysiert.

Dazu wurde der Immunkomplex aus T-Antigen, Antikörper und *Staphylococcus aureus* statt wie üblich nur mit NET-Puffer, zusätzlich mit 0,5 % LiCl enthaltendem NET-Puffer gewaschen; unter diesen stringenten Bedingungen würde ein vorhandenes angekoppeltes Enzym vom T-Antigen abgelöst werden. Dann wurde wie üblich mit oder ohne ATP inkubiert und DNA zugegeben (Abb. 4.9A). Da keinerlei Veränderung der Ergebnisse bei Vorhandensein von LiCl im Waschpuffer zu erkennen ist, ist diese Hypothese als unwahrscheinlich zu betrachten.

Auch ein Einfluß des zellulären Proteins p53, welches in der Wirtszelle mit T-Antigen assoziiert vorliegt und welches unter diesen stringenten Bedingungen nicht vom T-Antigen abgelöst würde, konnte auf Grund der Ergebnisse von L. Vakalopoulou in unserem Labor ausgeschlossen werden. Sie verwendete gereinigtes lytisches T-Antigen, das kein p53 enthielt, für den Versuch, was ebenfalls keinerlei Effekt auf die Inhibition der DNA-Bindung ausübte (L. Vakalopoulou, pers. Mitteilung).

Zu der gleichen Erkenntnis führte auch ein später ausgeführter Versuch, bei dem im Sucrosegradienten aufgetrennte, oligomere Formen des T-Antigen zur DNA-Bindung benutzt wurden (Abb. 4.12). Da die verschiedenen Formen nach ihrem Sedimentationsverhalten bestimmt worden waren und das T-Antigen-p53-Assoziat wegen seines größeren Gewichtes schneller sedimentiert, konnten die einzelnen Formen, mit Sicherheit vor allem die Monomerfraktion, ohne Verunreinigung mit p53 gewonnen werden. Auch diese Monomerfraktion zeigte ATP-induzierte Inhibition der DNA-Bindung.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Zeitspanne der Inkubation von T-Antigen mit ATP vor DNA Zugabe Einfluß auf die Inhibition hat. Hierzu wurde ATP gleichzeitig mit DNA und 15 Min. bzw. 30 Min. vor der DNA zugegeben (Abb. 4.9B, Spuren 3,5,6). Gegenüber der Probe ohne ATP-Zugabe in

Abb.4.9B, Spur 4, war die Inhibition unabhängig vom Zeitpunkt der ATP-Zugabe vor DNA-Addition. Sogar bei gleichzeitiger Zugabe von ATP und DNA war starke Inhibition der DNA-Bindung zu erkennen, was darauf schließen läßt, daß die Bindung von ATP unabhängig von der Stärke der Bindung sofort erfolgt, im Gegensatz zur DNA-Bindung, die auch nach 2 Stunden Inkubation von T-Antigen mit DNA noch nicht vollständig ist. Die Menge gebundener DNA kann durch verlängerte Inkubation noch erhöht werden. Auch Zugabe von 20-fachem Überschuß unspezifischer E.coli-DNA (Abb.4.9B, Spuren 3-6, gegenüber Spuren 1 und 2 ohne E.coli DNA) änderte nichts am inhibitorischen Effekt von ATP, obwohl der Betrag an gebundener DNA mit E.coli-DNA, aber ohne ATP-Zugabe im Vergleich zur gleichen Probe ohne E.coli-DNA etwas geringer war. Man konnte bei diesem Experiment auch beobachten, daß, obwohl keinerlei Unterschied in der Menge des spezifisch gebundenen HindIII-C-Fragments der pSV-WT-DNA mit oder ohne Vorinkubation mit ATP zu erkennen war, die unspezifisch gebundenen anderen Fragmente (Abb.4.9B, Spur 5) bei 15 minütiger Vorinkubation mit ATP völlig verschwunden sind (Abb.4.9B, Spur 6). Eine mögliche Interpretation dieser Beobachtung wäre, daß auch die unspezifische Bindungsaktivität des T-Antigen an DNA durch ATP inhibiert wird, vielleicht jedoch nicht so schnell und effektiv wie die spezifische Bindung.

Sollte eine ATP-abhängige, kovalente enzymatische Modifikation des T-Antigens, wie Phosphorylierung oder Adenylylierung, die Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens bewirken, würde diese das Vorhandensein divalenter Kationen, wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} , erfordern. Deshalb wurde die T-Antigen-DNA-Bindung mit ATP in An- und Abwesenheit dieser Ionen durchgeführt. Um im Puffer vorhandene Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zu entfernen, wurden zu den Proben, in welchen die Bindung an DNA in Abwesenheit von Kationen durchgeführt werden sollte, zu deren Chelatierung EGTA (für Ca^{2+}) oder EDTA (für Mg^{2+}) zugegeben (Abb.4.10).

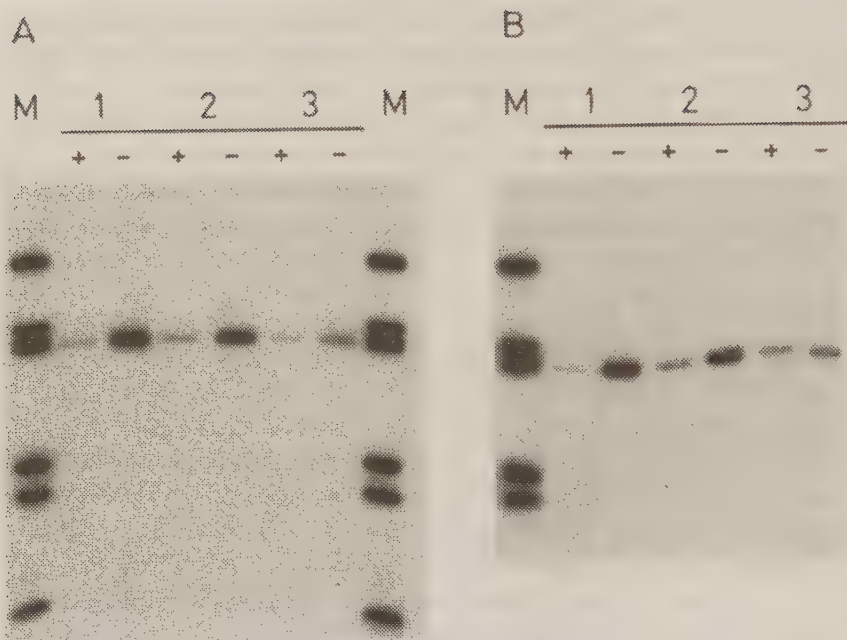


Abb. 4.10: ATP induzierte Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung in Anwesenheit chelatierender Agentien

A: Durch Immunfällung vorgereinigtes COS1-T-Antigen wurde in Bindungspuffer, der 5 mM EDTA (Spuren 1), 0,5 mM MgCl₂ (Spuren 2) oder 10 mM MgCl₂ (Spuren 3) enthielt, in An- (+) und Abwesenheit (-) von 20 mM ATP auf Bindung an markierte pSV-Wt-DNA-Fragmente untersucht.

B: Das Experiment wurde wiederholt, jedoch wurden, statt Mg-Ionen, Ca-Ionen und, statt EDTA, EGTA zur Chelatierung des Ca²⁺ verwendet.

Die Inhibition der DNA-Bindung ist jedoch mit und ohne Kationen gleich stark. Im Falle der Zugabe einer hohen Konzentration von Kationen (10 mM) nimmt sogar ohne ATP-Zugabe die Menge der gebundenen DNA ab. Dies könnte mit einem Einfluß der Kationen auf die Aggregation des T-Antigen zu Tetrameren zusammenhängen, da bei höheren Kationenkonzentrationen praktisch nur mehr Tetramer vorhanden ist (Runzler und Fanning, in Vorbereitung). Damit würde im gesamt vorhandenen T-Antigen der Tetrameranteil erhöht, dessen Bindungsaktivität jedoch schwächer ist (Runzler und Fanning, pers. Mitteilung).

Zur Ergänzung wurde das Experiment noch derart durchgeführt, daß ATP bereits direkt nach Bildung des Immunkomplexes aus T-Antigen und monoklonalem Antikörper zugesetzt wurde, dann erst die Staphylococcus aureus-Bakterien und nach dem Waschen des Komplexes die DNA zugegeben wurde (Abb.4.14A). Wäre nun das T-Antigen durch ATP-Zugabe kovalent modifiziert worden, dürfte diese Modifikation vom Waschen des Komplexes nicht beeinträchtigt werden, die Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens müßte erhalten bleiben. Dies ist jedoch nicht der Fall. Nach Wegwaschen des ATP, ist die DNA-Bindung genauso stark wie ohne Zugabe von ATP (Abb.4.14A, Spuren 1,3), im Gegensatz zur Kontrolle (Abb.4.14A, Spur 2), in der ATP erst nach dem Waschen zugegeben worden war, was zeigte, daß auch in diesem Experiment die Inhibition der DNA-Bindung durch ATP in der üblichen Stärke vorhanden war.

Aus diesen Experimenten konnte geschlossen werden, daß die ATP Inhibition nicht auf irgendeiner kovalenten Modifikation, sondern wahrscheinlich auf einfacher Bindung des ATP an das T-Antigen beruht.

4.1.5. Einfluß von ATP auf einige von verschiedenen Zelllinien exprimierte T-Antigene

Es war nun interessant, zu untersuchen, ob sich von verschiedenen Zelllinien exprimierte T-Antigene im Effekt der ATP-induzierten DNA-Bindungsinhibition gleich verhalten. Das von COS1-Zellen exprimierte T-Antigen ist ein Wildtyp-T-Antigen. Andere Zelllinien, wie VLM, mKSA, THK-1^t und H65/90B, exprimieren T-Antigene, die in Größe oder Funktion verändert sind (Huber et al., 1985). So enthalten z.B. VLM-Zellen nicht nur normalgroßes 90 kD T-Antigen, sondern zusätzlich ein sogenanntes Super-T-Antigen, ein Molekül von ca. 140 kD und ein T-Antigen von 100 kD. Auch die Zelllinie mKSA exprimiert mehrere T-Antigenmoleküle, eines von 90 kD und eines von 84 kD. Dies kommt durch die unterschiedliche Integration des SV40 Genoms in der transformierten Zelle zustande. Das T-Antigen der Zelllinie H65/90B bindet im Gegensatz zu den T-Antigenen der Zelllinien VLM, THK-1^t und mKSA nicht an die virale Bindungsstelle II und zeigt keine ATPase-Aktivität, wobei jedoch die Substratbindungsstelle womöglich erhalten ist und nur die enzymatische Funktion fehlt. Alle diese T-Antigene, mit Ausnahmen des COS1-T-Antigens sind außerdem unfähig, virale DNA-Replikation zu initiieren.

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Funktion und Größe der verschiedenen T-Antigene einen Einfluß auf die Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung ausüben, wurden diese T-Antigene im Vergleich mit COS1-Wildtyp-T-Antigen einer Immunpräzipitation unterworfen und mit und ohne Zugabe von 20 mM ATP an DNA gebunden. Die so gefällte DNA-Menge in der positiven Kontrolle ohne ATP-Zugabe ist abhängig von der jeweils vorhandenen T-Antigenmenge. Allen T-Antigenen gemeinsam ist jedoch der Effekt der Inhibition der DNA-Bindung unter Zugabe von ATP (Abb. 4.11). Es ist daher anzunehmen, daß keine der veränderten Eigenschaften in Größe

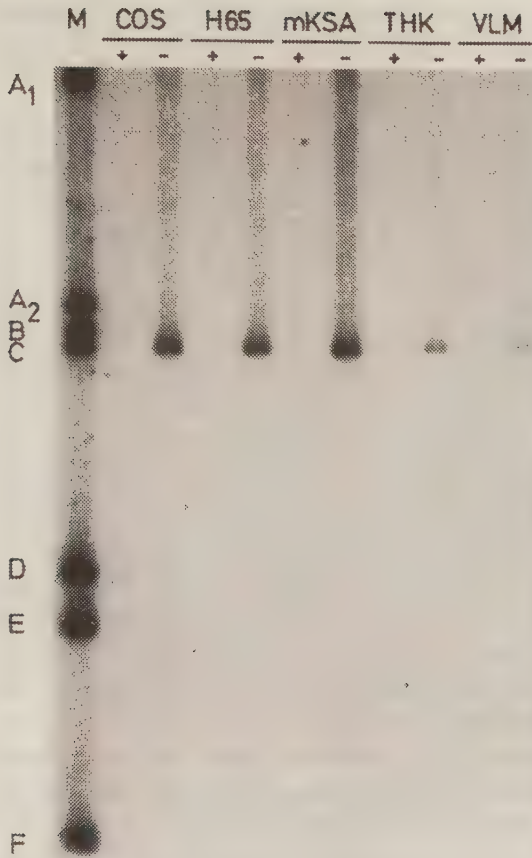


Abb. 4.11: Einfluß von ATP auf die DNA-Bindungsaktivität von T-Antigenen, welche von verschiedenen Zelllinien exprimiert werden

Gleiche Mengen T-Antigen-enthaltender Zellextrakte der transformierten Zelllinien COS1, H65-90B, mKSA, THK-1^t und VLM wurden immungefällt und sodann nach Vorinkubation mit (+) oder ohne (-) 20 mM ATP auf Bindung an endmarkierte HindIII-Fragmente von pSV-Wt-DNA untersucht.

und Funktion dieser T-Antigene in direktem Zusammenhang mit der ATP-abhängigen Inhibition der DNA-Bindung des großen T-Antigens steht.

Ebenso wurde der inhibitorische Effekt von ATP auf die DNA-Bindung des T-Antigens bei allen drei oligomeren Formen, des T-Antigen (Fanning et al., 1981) festgestellt. Dazu wurde T-Antigen aus dem Zellextrakt über Sucrose-Dichtegradienten Zentrifugation in die Formen Monomer, Dimer und Tetramer aufgetrennt. Alle wurden der üblichen Immunpräzipitation unterworfen und mit oder ohne vorheriger ATP-Zugabe mit DNA inkubiert (Abb. 4.12). Die Mengen der verschiedenen Formen wurden durch Dot blots untereinander verglichen (R.Runzler, pers. Mitteilung). Demnach lagen Mono-, Di-, und Tetramer im Massenverhältnis 1:1:2 vor. Die Bindung des Monomer und Dimer war etwa gleich stark, das Tetramer band weniger DNA, was vermutlich auf die schwächere DNA-Bindungsaktivität des Tetramers zurückzuführen ist (Runzler und Fanning, in Vorbereitung). Alle drei Formen zeigten durch ATP inhibierte DNA-Bindung. Folglich führt die Aggregation von T-Antigenmonomeren zum Di- oder Tetramer nicht zu einer Beeinflussung des nukleotidinduzierten inhibitorischen Effekts, die Bindung von ATP an T-Antigen wird dadurch nicht verhindert.

4.1.6. Reversibilität der Inhibition der T-Antigen DNA-Bindung

Da die Bindung des ATP an T-Antigen bereits durch einfaches Waschen der Proben aufgehoben und dadurch die Inhibition der DNA-Bindung rückgängig gemacht werden kann (Abb.4.14A), konnte geschlossen werden, daß die Bindung des ATP an T-Antigen wesentlich schwächer als die von DNA an T-Antigen ist (T-Antigen DNA Komplexe werden ohne große DNA-Verluste mehrfach gewaschen, um ungebundene DNA aus den Proben zu entfernen).

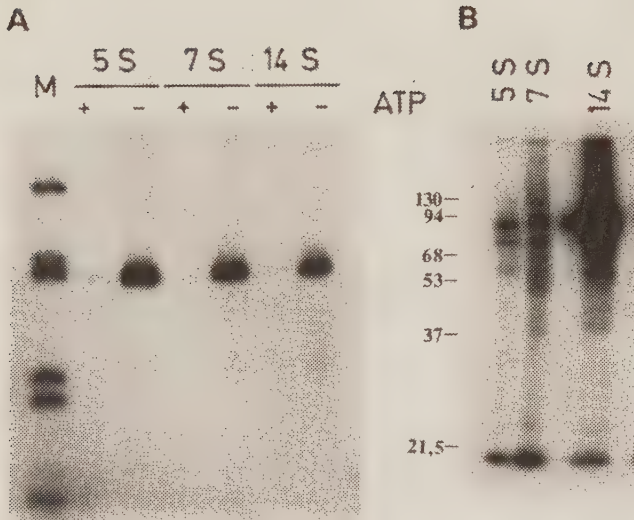


Abb. 4.12: Einfluß von ATP auf die DNA-Bindung der verschiedenen oligomeren Formen des T-Antigens

A: Über Sucrosegradienten getrennte Mono- (5S), Di- (7S) und Tetramerformen (14S) des T-Antigens wurden immungefällt, gewaschen, das Pellet in Bindungspuffer aufgenommen und mit (+) oder ohne (-) vorherige Inkubation mit 20 mM ATP auf Bindung an markierte pSV-Wt-DNA-Fragmente untersucht.

B: Die drei oligomeren T-Antigenformen (wie angegeben) wurden mit Hilfe der in Methoden beschriebenen Affinitätsmarkierung (3.13.) auf ihre ox-ATP-Bindungsfähigkeit untersucht. Am Rand wurde die Position einiger Markerproteine bekannter Größen angezeigt.

Um zu testen, ob, wenn DNA zuerst zugegeben wird, durch Zugabe von ATP auch die DNA-Bindung rückgängig gemacht werden kann, wurde nach 2 Stunden Inkubation mit DNA für 10, 20, 30 und 60 Minuten ATP zugegeben (Abb.4.13). Die gebundene Menge DNA wurde durch Zugabe von ATP auf dem Niveau von 2-stündiger Inkubation gehalten, sie erreichte nicht ganz gleichstarke Bindung wie nach 3 Stunden Inkubation ohne ATP (Abb.4.13, Spur 6). Jedoch kann durch Zugabe von ATP bereits gebundene DNA innerhalb eines Zeitraums von einer Stunde und in Anwesenheit von überschüssiger ungebundener DNA nicht vom T-Antigen abgelöst werden.

Auch wenn die DNA-Inkubation nicht 2 Stunden lang bis zur fast vollständigen Bindung, sondern nur für 30 Minuten durchgeführt wurde, war der gleiche Effekt sichtbar (Abb.4.14B). Die Bindung wurde auf dem Niveau von 30-minütiger DNA-Inkubation (Abb.4.14B, Spur 3) gehalten, Zugabe von ATP für Zeiträume von 10, 30 und 60 Minuten (Abb.4.14B, Spuren 4,6) ließ die gebundene DNA-Menge nicht auf die gebundene Menge der Kontrolle (Spur 2) ansteigen. Jedoch ist auch wenn mit DNA nur 30 Minuten inkubiert wurde, nach Zugabe von ATP keine Reversibilität der DNA-Bindung zu erkennen. In beiden Experimenten ist aber ein Überschuß an DNA vorhanden.

Es war daher interessant herauszufinden, ob die Situation nach Inkubation mit DNA bis zur Einstellung des Gleichgewichts und nachfolgender Entfernung des Überschusses ungebundener DNA anders wäre; d.h. ob dann ATP die Entfernung von bereits gebundener DNA vom T-Antigen bewirken könnte. Dazu wurden nach erfolgter DNA-Inkubation zwei Proben gewaschen (Abb.4.14C, Spuren 3,4) und zwei Proben ungewaschen (Abb.4.14C, Spuren 1,2) mit ATP bzw. Puffer parallel eine Stunde lang inkubiert. In beiden Fällen war der Unterschied der gebundenen DNA-Mengen mit und ohne ATP minimal, inkubierte man jedoch gewaschene Proben mit ATP

	-	+	+	+	+	-	ATP
M	0	10	20	30	60	60	min

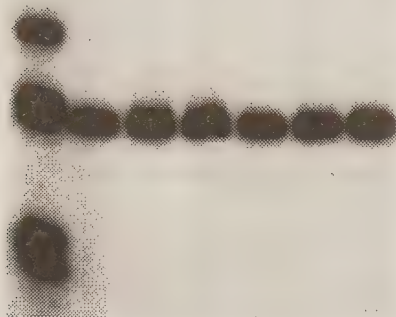


Abb. 4.13: Versuch zur Reversibilität der
Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens

Immungereinigtes COS1-T-Antigen wurde 2 Stunden mit markierten pSV-Wt-DNA-Fragmenten inkubiert. Dann wurde für verschiedene Zeitintervalle (10, 20, 30, 60 Minuten) 20 mM ATP zugegeben; zu der Probe in der letzten Spur wurde kein ATP zugegeben, die Probe aber 3 Stunden lang mit DNA-Fragmenten inkubiert.

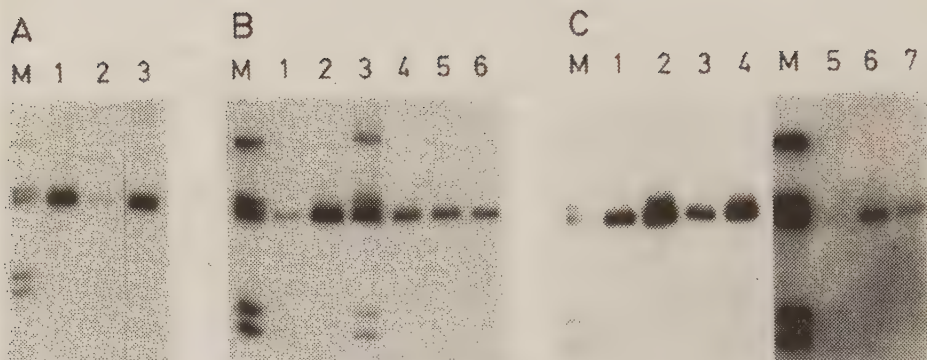


Abb. 4.14: Reversibilität der Nukleotidinhhibition der T-Antigen-DNA-Bindung

A: Immungereinigtes COS1-T-Antigen wurde 30 Min. lang bei 0°C in Anwesenheit (Spur 1) oder Abwesenheit (Spuren 2,3) von 20 mM ATP in Bindungspuffer vorinkubiert. Die Immunkomplexe wurden abzentrifugiert, dreimal mit NET gewaschen und in Bindungspuffer aufgenommen. Eine Probe (Spur 2) wurde mit 20 mM ATP, die anderen Proben in den Spuren 1 und 3 ohne ATP 30 Min. bei 0°C inkubiert. Dann wurden endmarkierte pSV-Wt-DNA-Fragmente zu allen Proben zugegeben. Gebundene DNA wurde nach 1 Stunde durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

B: Immungereinigtes COS1-T-Antigen wurde 30 Min. in An- (Spur 1) oder Abwesenheit (Spur 2) von 20 mM ATP und dann 2 Stunden lang mit pSV-Wt-Fragmenten inkubiert. Die Proben in den Spuren 3-6 wurden zuerst 30 Min. lang mit pSV-Wt-DNA-Fragmenten inkubiert. Die Inkubation wurde dann unter Zugabe von 20 mM ATP für 10 Min. (Spur 4), 30 Min. (Spur 5) oder 60 Min. (Spur 6) fortgesetzt.

C: Immungereinigtes COS1-T-Antigen wurde 2 Stunden bei 0°C mit endmarkierten pSV-Wt DNA Fragmenten inkubiert. Anschließend wurde bei den Proben in den Spuren 3-7 ungebundene überschüssige DNA weggewaschen und die Immunkomplexe in Bindungspuffer mit (Spuren 3,5) oder ohne (Spuren 2,4,6,7) Zugabe von 20 mM ATP wiederaufgenommen, bzw. 20 mM ATP einfach zur ungewaschenen Probe zugegeben (Spur 1). Zu der Probe in Spur 7 wurden statt Nukleotid 0,25 µg unmarkierte pSV-Wt-DNA-Fragmente zugegeben. Die Inkubation wurde dann 1 Stunde (Spuren 1-4) oder 16 Stunden (Spuren 5-7) lang fortgesetzt.

bzw. Puffer 16 Stunden lang, konnte man einen drastischen Effekt beobachten: die Probe, welche mit ATP inkubiert worden war, zeigte keinerlei DNA-Bindung mehr (Abb.4.14C, Spuren 5), wogegen auch nach 16 Stunden Inkubation ohne ATP die DNA noch fest an T-Antigen gebunden war (Abb.4.14C, Spur 6). Es wäre nun möglich, daß ein einfaches Gleichgewicht vorliegt, daß von DNA abdissoziiertes T-Antigen ohne weitere Veränderung einfach an ATP bindet. Der gleiche Effekt müßte aber bei Zugabe von überschüssiger, nicht markierter pSV-Wt-DNA zu beobachten sein, woran T-Antigen ebenfalls binden müßte und dadurch die Menge an gebundener radioaktiv markierter DNA in gleicher Weise vermindert sein müßte. Dies ist jedoch nicht der Fall. Durch Zugabe eines Überschusses an unmarkierter pSV-WT-DNA für 16 Stunden unter gleichen Bedingungen wurde nur ein leichtes Abnehmen der Menge gebundener markierter DNA bewirkt (Abb.4.14C, Spur 7). Dies legt die Vermutung nahe, daß ATP das gebundene T-Antigen so verändert, daß es von der DNA abdissoziiert; im Falle der Zugabe von kalter pSV-Wt-DNA wurde die gebundene Menge DNA nur wenig vermindert, d.h. nur wenig T-Antigen dissoziierte von der markierten DNA ab.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Resultate, daß reine ATP-Bindung und nicht kovalente Modifikation die Inhibition der Bindung von T-Antigen an DNA bewirkt. Diese Bindung erfolgt sehr rasch, schon bei gleichzeitiger Zugabe von ATP und DNA ist der Effekt genauso stark, wie nach halbstündiger Inkubation mit ATP vor DNA Zugabe - dies im Gegensatz zur DNA-Bindung, welche ihr Gleichgewicht erst nach über 2 Stunden erreicht. Die Bindung des ATP ist durch Wegwaschen des ATP rückgängig zu machen, während die Bindung von T-Antigen an DNA erst nach Entfernen überschüssiger DNA und langer Inkubation mit ATP vollständig reversibel wird. Zugabe von ATP nach DNA-Addition bewirkt, daß sofort keine weitere DNA mehr gebunden werden kann. Der Effekt der Inhibition der DNA-Bindung ist weder abhängig vom verwendeten monoklonalen Antikörper, noch von der

T-Antigen-exprimierenden Zelllinie, ebenfalls nicht davon, ob T-Antigen bereits mit einem oder zwei monoklonalen Antikörpern komplexiert vorliegt oder nicht. Der inhibitorische Effekt wurde bei drei verschiedenen Temperaturen beobachtet und es erfolgte weder eine Dissoziation des T-Antigens vom Immunkomplex, noch eine meßbare Degradation des Proteins. Ebenfalls ist eine Konkurrenz zwischen ATP und DNA um die gleiche Bindungsstelle unwahrscheinlich, da die DNA-Bindung, obwohl sie durch die Stärke der Bindung favorisiert sein sollte, nahezu völlig inhibiert wird.

Es wurde daher ein Modell (Abb.4.15) entwickelt, welches mit allen experimentellen Befunden übereinstimmt. Es setzt voraus, daß T-Antigen ein allosterisches Protein ist, was bei seiner Größe und Vielzahl von biochemischen Funktionen nicht als unwahrscheinlich angesehen werden kann. Diesem Modell entsprechend kann T-Antigen in zwei Konformationen vorliegen, einer Nukleotid-bindenden und einer DNA-bindenden Form. Sobald ein geeignetes Nukleotid an eine bestimmte Stelle am T-Antigenmolekül bindet, verändert sich seine Konformation derart, daß es in der Nukleotid-bindenden Form vorliegt und damit inaktiv für DNA-Bindung ist. Umgekehrt verändert Bindung von DNA an eine andere Stelle die Konformation zur DNA-bindenden Form, die ihrerseits keine Nukleotide binden kann. Nach Entfernen des entsprechenden Effektors können die beiden Formen ineinander übergehen, jedoch können nicht beide Effektoren dieselbe Form des T-Antigens binden. Der Übergang von der Nukleotid-bindenden in die DNA-bindende Form ist hier offensichtlich schneller als der umgekehrte Weg.

4.1.7. Nachweis von Allosterie durch mutierte T-Antigene

Um die aus den vorherigen Experimenten sich anbietende Erklärung einer Allosterie des T-Antigen-Moleküls zu beweisen, wurden DNA-Bindungsversuche mit mutierten



Abb. 4.15: Modell für die allosterische Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindungsaktivität durch Purinnukleotide

Dieses Modell ist im Text ausführlich erklärt.

T-Antigenen, nämlich den Proteinen D2-T, T_{Pst} und T_{HindIII}, durchgeführt.

Das D2-T-Antigen ist ein Adenovirus 2-SV40 Hybridprotein, welches am Aminoterminus adenokodierte Sequenzen trägt und dessen SV40 T-Antigen-Sequenzen erst nach der T-Antigen Intron-"splice"- Stelle bei Aminosäure 115 (Hassell et al., 1978) beginnen. Der Aminoterminus des T-Antigens ist deletiert. Das Protein bindet DNA (Tjian and Robbins, 1979, Abb.4.16A) und besitzt ATPase-Aktivität (Tjian and Robbins, 1979). Dieses Hybridprotein zeigte keinerlei Inhibition der DNA-Bindung durch ATP, im Gegenteil schien die Bindung gegenüber der Probe ohne ATP etwas stärker zu sein (Abb.4.16A). Das Protein wurde mit dem monoklonalen Antikörper Pab 1630 gefällt, da die Bindungsstelle für den sonst verwendeten Antikörper Pab 108 auf dem D2-T-Antigen nicht vorhanden ist. Mit dem schwächer bindenden Antikörper Pab 405 konnte fast keine Bindung festgestellt werden. Auch wenn die DNA-Bindungsinhibition in diesem Experiment mit Pab 1630 bei COS1-T-Antigen schwächer ist als mit Pab 108, so wurde in einem früheren Experiment (Abb.4.6) bereits gezeigt, daß auch mit diesem Antikörper die Bindungsinhibition gleichstark vorhanden ist. Es ist deswegen unwahrscheinlich, daß das völlige Fehlen einer Bindungsinhibition im Fall des D2-T-Antigens daherrührt.

Die beiden in E.coli exprimierten T-Antigen-Mutanten T_{Pst} (T-Antigensequenzen vom Aminoterminus bis zur Aminosäure 537) und T_{HindIII} (T-Antigensequenzen vom Aminoterminus bis zur Aminosäure 272) zeigten unterschiedliches Verhalten im Bezug auf die DNA-Bindungsinhibition. T_{Pst}-Bindung an DNA wurde durch ATP stark gehemmt, wogegen T_{HindIII} zwar an DNA binden konnte, jedoch keinerlei Inhibition der DNA-Bindung mehr erfolgte (Abb.4.17A).

Durch die Tatsache, daß zwei Mutanten zwar an DNA binden, jedoch keine ATP-induzierte Inhibition der DNA-Bindung mehr zeigen, wurde eindeutig gezeigt, daß DNA-Bindung und

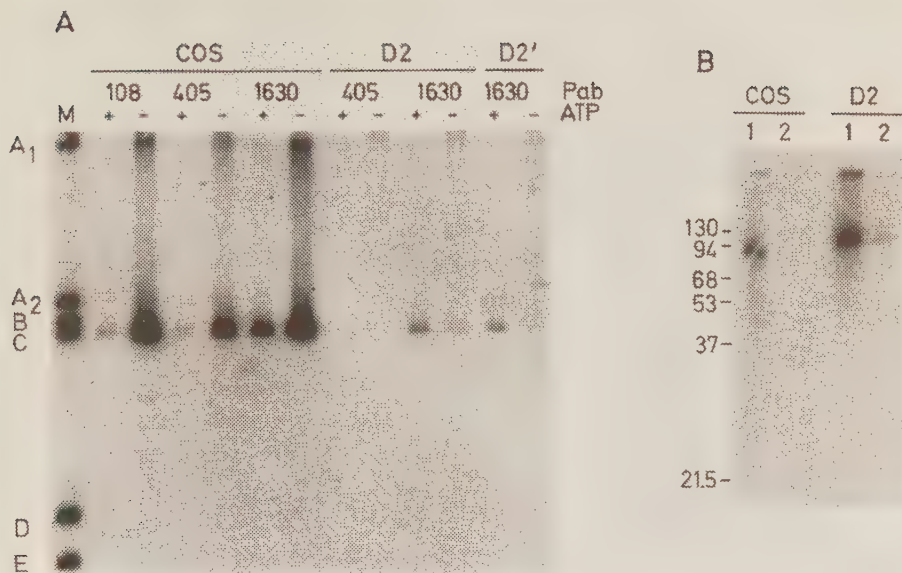


Abb. 4.16: D2-T-Antigen zeigt keinerlei Inhibition der DNA Bindung des T-Antigens

A: T-Antigen-enthaltende COS1- und D2T-Antigen-enthaltende HeLa-Zell-extrakte wurden mittels verschiedener Antikörper wie angegeben immunogereinigt und dann mit (+) oder ohne (-) Vorinkubation mit 20 mM ATP auf Bindung an markierte pSV-Wt-DNA-Fragmente untersucht. In der Spur, die mit D2' (+) gekennzeichnet ist, wurde mit 20 mM ATP vor dem Waschen des Immunkomplexes inkubiert.

B: Die gleiche Menge der COS1- bzw. HeLa-Zell-extrakte wurde auf Affinitätsmarkierung mit α - 32 P-oxATP untersucht. Die folgende Immunfällung wurde mit dem monoklonalen Antikörper 1630 statt wie sonst mit Pab 108 durchgeführt. In den Spuren 1 wurde wie üblich über Nacht mit oxATP inkubiert, in den Spuren 2 dagegen nur eine halbe Stunde. Die Position einiger Markerproteine bekannter Größen im Gel wurde am Rand angedeutet.

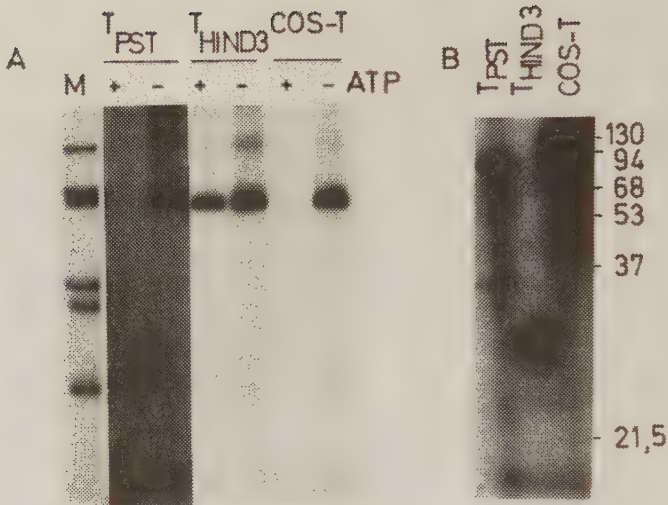


Abb. 4.17: Eine in *E. coli* exprimierte Deletionsmutante zeigt keinerlei Inhibition der DNA-Bindung, die Markierung durch oxATP bleibt jedoch erhalten.

A: Die beiden T-Antigen-Deletionsmutanten T_{PST} und T_{HIND3} wurden durch Immunfällung aus der beschallten Bakteriensuspension isoliert und sodann im Vergleich mit COSI-T-Antigen mit (+) und ohne (-) Anwesenheit von 20 mM ATP deren Bindungsfähigkeit an radioaktiv markierte pSV-Wt-DNA-Fragmente untersucht. Die Mengen an T-Antigen waren bei den Mutanten verschieden (von T_{HIND3} war etwa 5 mal soviel vorhanden wie von T_{PST}, wie aus einem Laemmli-Polyacrylamidgel geschlossen wurde, auf das beide T-Antigene aufgetragen worden waren (A. Arthur, pers. Mitteilung)), daher wurde für die Spuren des T_{PST}-Antigen eine längere Exponierung (24 h) als für die anderen Spuren (8 h) des Gels gezeigt.

B: Beide Mutanten T_{PST} und T_{HIND3} wurden einer Affinitätsmarkierung im Vergleich mit COSI-T-Antigen unterworfen. Wieder war die Menge T_{PST}-Antigen etwa 5 mal geringer (A. Arthur, pers. Mitteilung) als die der beiden anderen Proteine. Auch kann man ebenfalls markierte Abbauprodukte bei diesem T-Antigen erkennen. Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Größen einiger mit auf das Gel aufgetragener Markerproteine an.

ATP-Bindung an verschiedenen Stellen des Moleküls erfolgen. Es wird ganz eindeutig ein Ereignis an einer Stelle des Moleküls von einem Ereignis an anderer Stelle beeinflusst oder sogar kontrolliert. Damit ist die Eigenschaft der Allosterie beim T-Antigen bewiesen. Da bei den beiden Mutanten D2 und $T_{HINDIII}$ unterschiedliche Teile des Moleküls deletiert sind, kann man außerdem darauf schließen, daß für die Einnahme der Nukleotid-bindenden Konformation auch die Größe des Moleküls bzw. das Vorhandensein bestimmter Domänen eine Rolle spielt.

4.2. Lokalisation der allosterischen Nukleotidbindungsstelle

Für das große Polyoma-T-Antigen und für das SV40 T-Antigen sind bisher zwei Nukleotidbindungsstellen in der Literatur beschrieben: zum einen die oxATP-Bindungsstelle, welche bei der Affinitätsmarkierung des T-Antigen besetzt wird (Clertant und Cuzin, 1982; Clertant et al., 1984), und zum anderen die Substratbindungsstelle für die ATPase-Aktivität (Giacherio and Hager, 1979; Tjian and Robbins, 1979; Clark et al., 1981). Im Falle von Polyoma-T-Antigen wurde von Clertant et al. anhand ihrer Ergebnisse geschlossen, daß die beiden Stellen voneinander verschieden sind. Für das SV40-T-Antigen ist dies noch nicht genauer untersucht worden, es wäre aufgrund der Ähnlichkeit beider Moleküle jedoch vorstellbar, daß auch hier zwei verschiedene Nukleotidbindungsstellen vorhanden sind.

4.2.1. Untersuchungen zur oxATP-Bindungsstelle als möglicher allosterischer Nukleotidbindungsstelle

Die oxATP-Bindungsstelle wurde von Clertant et al. (1984) anhand ihrer Ergebnisse dem carboxyterminalen Bereich des T-Antigen-Moleküls zugeordnet. Dort kann das T-Antigen durch Bindung von oxidiertem radioaktivem ATP an einen Lysinrest

und nachfolgender Reduktion der entstandenen Schiffischen Base selbst radioaktiv markiert werden. Die Bindung an diese Stelle erfolgt jedoch über die Dialdehydgruppe des Riboseteils des ATP und nicht über die Adenineinheit. Die ox-ATP-Affinitätsmarkierung der mutierten T-Antigene D2, T_{Pst} und T_{IndIII} - alle drei wurden durch radioaktives oxidiertes ATP markiert (Abb.4.16B, 4.17B)-, ergab nun aber, im Widerspruch zu Clertant et al., 1984, daß eine ox-ATP-Affinitätsmarkierungsstelle zwischen den Aminosäuren 115 und 272 liegen muß, sonst könnten nicht alle drei Mutanten markiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre noch das Vorhandensein einer zweiten aminoterminalen ox-ATP-Bindungsstelle zusätzlich zur beschriebenen am Carboxyterminus. Jedenfalls deutete dieser Versuch daraufhin, daß die ox-ATP-Bindungsstelle nicht an der allosterischen Konformationsänderung des T-Antigens durch ATP-Bindung beteiligt ist, da alle Mutanten markiert wurden, wogegen die ATP-induzierte DNA-Bindungsinhibition nur bei einer dieser Mutanten, nämlich bei T_{Pst}, zu beobachten war.

Außerdem wurde mit Hilfe der oxATP-Affinitätsmarkierungs-Methode statt nur, wie beschrieben (Clertant and Cuzin, 1982) mit oxidiertem radioaktivem ATP, T-Antigen ebenfalls mit oxidiertem radioaktivem GTP und auch UTP erfolgreich radioaktiv markiert (Abb.4.18). Bei der Untersuchung der ATP-induzierten DNA-Bindungsinhibition hatte UTP als allosterischer Effektor dagegen keinerlei Wirkung. Auch Zugabe von E.coli- und unmarkierter pSV-Wt-DNA verhinderte nicht die Markierung von T-Antigen mit radioaktivem ATP und GTP (Abb.4.18).

Wurde derselbe Affinitätsmarkierungsversuch mit der gleichen Menge kaltem oxATP und oxUTP ausgeführt und nachfolgend das mit oxATP oder oxUTP komplexierte T-Antigen auf DNA-Bindung untersucht, zeigte dies keinerlei inhibitorischen Effekt (Abb.4.19, Spuren 1-6). Dagegen übte Zugabe von 20 mM ATP

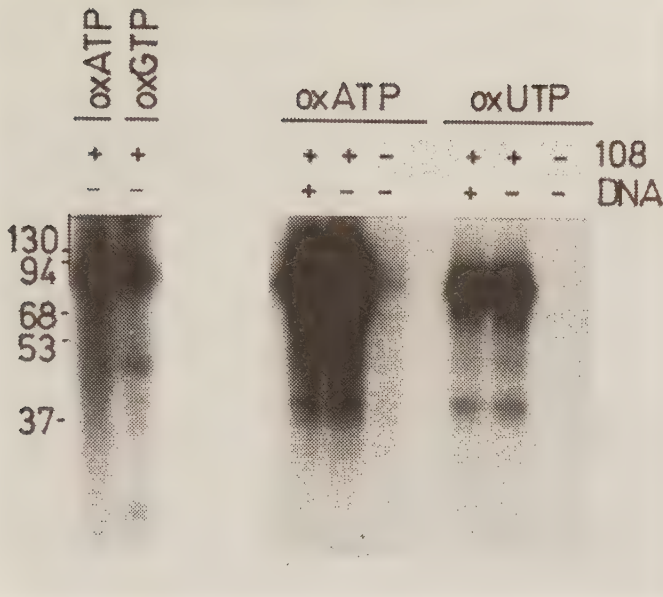


Abb. 4.18: T-Antigen zeigt auch bei Affinitätsmarkierung eine breite Nukleotidspezifität

T-Antigen enthaltender COS1-Zell-extrakt wurde durch Zugabe von α - ^{32}P - αATP , α - ^{32}P - αGTP und α - ^{32}P - αUTP wie in Methoden beschrieben markiert. In den Proben welche mit -108 bezeichnet sind wurde die Fällung zur Kontrolle statt mit spezifischem monoklonalem Antikörper mit nichtimmun Mausimmunglobulin vorgenommen. Zu den Proben, welche mit +DNA gekennzeichnet sind, waren vor der Markierung mit oxidiertem Nukleotid 10 μg E.coli-DNA und 0,25 μg kalte pSV-Wt-DNA-Fragmente zugegeben worden. Nach anschließender Fällung des markierten T-Antigens wurde ein Laemmli-Polyacrylamidgel gefahren und davon eine Autoradiographie hergestellt. Am seitlichen Rand sind die Molekulargewichte einiger Markerproteine angegeben.

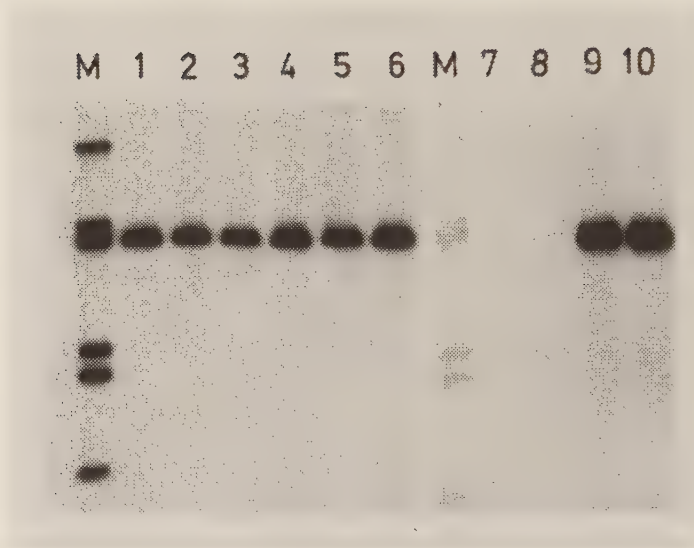


Abb. 4.19: Komplexierung von T-Antigen mit oxidierten kalten Nukleotiden zeigt keinen inhibitorischen Effekt auf die DNA-Bindung

T-Antigen-enthaltender COS1-Zell-extrakt wurde mit kaltem oxATP (Spur 1: 10 μ M, Spuren 2,7,9: 30 μ M) oder oxUTP (Spur 3: 10 μ M, Spur 4: 30 μ M) unter den für radioaktive Affinitätsmarkierung verwendeten Bedingungen inkubiert, der Probe in Spur 5 wurde nur 10 μ l 100 mM NaCNBH₃, denen in den Spuren 6, 8 und 10 nur Puffer zugegeben. Nach Immunfällung und Waschen mit NET-Puffer wurden alle Proben in Bindungspuffer aufgenommen und mit (Spuren 7,8) oder ohne (alle anderen) Zugabe von 20 mM ATP auf Bindung an markierte pSV-Wt-DNA-Fragmente untersucht.

nach der kovalenten Bindung von oxATP an T-Antigen denselben inhibitorischen Effekt aus, wie ohne Anwesenheit von oxATP (Abb.4.19, Spuren 7-10). Zugabe von 30 μ M ATP zeigte aber eine aus der Konzentrationsabhängigkeitskurve (Abb.4.3) berechnete Verringerung der DNA-Bindungsaktivität um 50%, die schwächeren Inhibitoren ADP und AMP-PNP zeigten nach dieser Kurve bei gleicher Konzentration immerhin 25%ige Inhibition. Zwar waren die Proben mit oxATP und oxUTP gewaschen worden, was jedoch bei kovalent gebundenem oxidiertem Nukleotid zu keiner Dissoziation führen sollte, im Gegensatz zu unoxidiertem nicht kovalent gebundenem Nukleotid.

Ein weiteres Experiment, das mit den verschiedenen oligomeren Formen des T-Antigens, mit Mono-, Di- und Tetramer, durchgeführt wurde, ergab, daß mit Hilfe der oxATP-Affinitätsmarkierungsmethode hier das Tetramer am stärksten markiert wurde (Monomer:Dimer:Tetramer = 1:1:15), Monomer und Dimer dagegen nur schwach (Abb.4.12B). Im Bindungsexperiment mit und ohne ATP (Abb.4.12A) dagegen wurde bei allen drei Formen die DNA-Bindung etwa gleichstark negativ beeinflusst.

4.2.2. Untersuchungen zur ATPase-Substratbindungsstelle

Die bisher durchgeführten Experimente zur Lokalisation der allosterischen Nukleotidbindungsstelle machen eine Beteiligung der oxATP-Bindungsstelle zumindest unwahrscheinlich. Als nächstes wurde daher die Möglichkeit der Beteiligung der ATPase-Substratbindungsstelle am allosterischen Effekt untersucht. Da sowohl nicht-spaltbare ATP-Analoga eine Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens verursachen, als auch ein T-Antigen (H65/90B) diesen Effekt zeigte, welches keine ATPase-Aktivität besitzt und eine etwa gleichlange Mutante wie T_{Pst}, dl 1061 (Clark et al., 1983), ebenfalls ATPase-defekt ist, kann eine Verbindung mit der ATPase-Aktivität selbst ausgeschlossen werden.

Jedoch wäre es möglich, daß auch ohne ATP-Spaltung eine Bindung an die ATPase-Substratbindungsstelle eine allosterische Konformationsänderung des T-Antigens bewirken könnte. So wurde in einer Serie von Experimenten der ATPase-Reaktionsmischung statt wie üblich, außer radioaktivem γ - ^{32}P -ATP, 0,5 μM rATP, dieselbe Menge dATP, GTP, UTP, NAD^+ , AMP-PNP sowie $\text{ATP}\gamma\text{S}$ zugegeben. Das Ergebnis dieser Versuche (Abb.4.20) zeigt, daß die ATPase-Reaktion durch Zugabe von dATP, GTP und $\text{ATP}\gamma\text{S}$ stark inhibiert wird, UTP und AMP-PNP geringe Inhibition und NAD^+ fast keinen Effekt zeigte. Daneben wurden radioaktives γ - ^{32}P -GTP und γ - ^{35}S - $\text{ATP}\gamma\text{S}$ unter Zugabe der jeweiligen "kalten" Nukleotide ebenfalls auf Spaltung durch die ATPase-Aktivität des T-Antigens untersucht. Beide Nukleotide wurden nicht gespalten. Die ATPase-Aktivität erreichte jedoch unter den üblichen Bedingung (siehe 3.15.)

die in der Literatur beschriebenen Werte (Tjian et al., 1980). Eine mögliche Erklärung wäre, daß die die DNA-Bindung inhibierenden Nukleotide an die

ATPase-Substratbindungsstelle zwar binden können, jedoch nicht gespalten werden und dadurch die normale ATP-Spaltung ebenfalls gehemmt wird. UTP, AMP-PNP und NAD^+ , welche ja die DNA-Bindung nicht inhibieren bzw. nur bei 100fach höherer Konzentration (AMP-PNP) als ATP (Abb.4.1, 4.3), zeigen auch hier nur einen weniger starken Effekt. Daß auch dATP einen negativen Einfluß auf die ATP-Hydrolyse zeigt, ist nicht verwunderlich, da dATP ($K_M = 0,5 \mu\text{M}$) sogar ein besseres Substrat für die ATPase-Aktivität darstellt als ATP ($K_M = 4 \mu\text{M}$, Clark et al., 1984).

Also scheint die ATPase-Substratbindungsstelle ein möglicher Kandidat für die Lokalisation der allosterischen ATP-Bindungsstelle zu sein.

markiert unmarkiert	γ - ^{32}P -ATP	γ - ^{32}P -GTP	γ - ^{35}S -ATP S
ATP	27 nmol/h mg =100%		0
ATP γ S	0		0
GTP	0,6 nmol/h mg =3,7%	0	
dATP	1.6 nmol/h mg =8,4%		
AMP-PNP	6 nmol/h mg =24%		
UTP	5,7 nmol/h mg =23%		
NAD ⁺	18 nmol/h mg =72%		

Abb. 4.20: Tabellarische Darstellung der ATPase-Aktivität unter Einfluß verschiedener Nukleotide

COS1-T-Antigen wurde auf seine Fähigkeit radioaktives γ - ^{32}P -ATP, γ - ^{32}P -GTP und γ - ^{35}S -ATP γ S zu spalten untersucht. Ebenso wurde seine Fähigkeit zur Spaltung von γ - ^{32}P -ATP bei Zugabe von 0,5 μM dATP, GTP, ATP γ S, AMP-PNP, NAD⁺ und UTP im Vergleich zur üblichen Reaktion mit 0,5 μM ATP untersucht. Wo die Spaltungsaktivität mit 0 bezeichnet wurde, war die Menge gespaltener Nukleotide gleich oder sogar kleiner als beim Kontrollwert.

5. Diskussion:

5.1. Die Inhibition und deren mögliche Wirkungsmechanismen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Bindung des SV40 T-Antigens an Bindungsstelle I und II im Replikationsursprung der SV40-DNA bereits durch niedrige Konzentrationen von Nukleotiden wie ATP, GTP, ADP und deren nicht spaltbare- oder schwefelhaltige Analoga stark inhibiert wird.

Es wurde nachgewiesen, daß weder die Benutzung eines speziellen monoklonalen Antikörpers (Abb.4.6), die Temperatur bei der Immunpräzipitation (Abb.4.11C), die Zelllinie, welche als T-Antigen-Quelle benutzt wurde (Abb.4.9), die Anwesenheit von 20-fachem Überschuß unspezifischer DNA (Abb.4.11B), noch die Verwendung von zwei verschiedenen DNAs zur Bindung (Abb.4.4) den inhibitorischen Effekt beeinflussten. Auch wurde eine Dissoziation des T-Antigens vom vorgeformten Immunkomplex ausgeschlossen (Abb.4.6) und der gesamte DNA-Bindungstest noch unter anderen Bedingungen, nämlich mit umkomplexiertem T-Antigen im Zellrohextrakt (Abb.4.8), durchgeführt. Andere Daten aus unserem Labor zeigen ebenfalls bei Verwendung eines Gelretentionsversuchs die Inhibition der DNA-Bindung unter Zugabe von ATP oder ATP γ S zu biochemisch gereinigtem, lytischem T-Antigen. Hierbei wurde außerdem eine dritte, synthetische DNA, das Plasmid pSDL 13 verwendet, welches nur 19 bp der SV40 T-Antigen-Bindungsstelle I enthält (Ryder et al., 1985; Vakalopoulou, pers. Mitteilung). Auch unter diesen Bedingungen konnte man fast völlige Inhibition der Bindung von T-Antigen an DNA durch Zugabe von ATP und ATP γ S erkennen.

Man konnte daher davon ausgehen, daß die Inhibition der Bindung von T Antigen an DNA durch ATP eine neue Eigenschaft des SV40 T-Antigen ist.

Als mögliche Mechanismen der Inhibition wurde unter anderem die Möglichkeit einer kovalenten Modifikation des T-Antigen-Moleküls untersucht. Da jedoch divalente Kationen für das Vorhandensein der Inhibition nicht benötigt wurden (Abb.4.12), die Inhibition durch Entfernen des ATP sehr leicht reversibel war (Abb.4.13A) und auch nicht spaltbare ATP-Analoga wie AMP-PNP und AMP-PCP die Inhibition der DNA Bindung, wenn auch in schwächerem Maß, bewirkten, konnte diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse wiesen vielmehr darauf hin, daß einfache Bindung des ATP oder eines der anderen inhibierenden Nukleotide der Grund für die Inhibition der DNA-Bindung ist.

Daher wurde als nächste Frage gestellt, ob ATP mit DNA um dieselbe Bindungsstelle am T-Antigen konkurriert, oder ob es durch Bindung an eine andere Stelle das T-Antigen-Molekül allosterisch beeinflussen und dadurch DNA-Bindung unmöglich machen könnte. Würde Konkurrenz um dieselbe Bindungsstelle auf dem Protein vorliegen, müßte die Bindung von DNA gegenüber der des ATP favorisiert sein (DNA-Komplexe überstehen dank der festen Bindung von T-Antigen an DNA ($K_D = 4 \times 10^{-10}$ M, R. Runzler, pers. Mitteilung) Waschen mit NET-Puffer unbeschadet, während die ATP-Bindung von T-Antigen hierbei bereits völlig verloren geht (Abb.4.13A), woraus man schließen kann, daß die ATP-Bindung an T-Antigen mindestens 100-1000mal schwächer ist, als die DNA-Bindung). Zusätzliche Daten gegen das Modell der Konkurrenz um dieselbe Bindungsstelle ergaben sich aus der Untersuchung von Deletionsmutanten, die zwar noch DNA binden können, aber keinerlei Inhibition dieser Bindung durch ATP-Zugabe mehr zeigen (Abb.4.18, 4.19). Diese Ergebnisse sind dagegen gut vereinbar mit der Vorstellung, daß T-Antigen ein allosterisches Protein ist.

In diesen Mutanten ist offensichtlich zwar die Bindungsstelle für DNA noch erhalten, jedoch entweder die allosterische ATP-Bindungsstelle deletiert, oder das Molekül

aufgrund der Deletion eines großen Teils nicht mehr in der Lage, seine Konformation nach ATP-Bindung zu verändern.

Es ist daher anzunehmen, daß T-Antigen in mindestens zwei stabilen Konformationen vorliegt, einer Konformation T_M , welche aktiv für Nukleotid-, jedoch nicht für DNA-Bindung ist, und einer Konformation T_D , welche umgekehrt DNA, aber nicht Nukleotid bindet. Es ist anzunehmen, daß diese Konformationen in Lösung im Gleichgewicht vorliegen und daß sie bei Entfernen des einen und Zugabe des anderen Effektors ineinander übergehen können; diese Umwandlung scheint jedoch relativ langsam stattzufinden (Abb.4.13B,C). Welche Konformation unter bestimmten Bedingungen tatsächlich vorliegt, würde daher von der relativen Konzentration der beiden Liganden DNA und ATP und deren Affinität für T-Antigen abhängen.

5.2. Vergleich der allosterischen Nukleotid-Bindungsstelle mit der ox-ATP-Bindungsstelle

Die Lokalisation der ATP-Bindungsstelle, welche für die Inhibition der DNA-Bindung verantwortlch ist, konnte zwar nicht definitiv bestimmt werden, jedoch konnte ihre Lage anhand der Daten mit den mutierten T-Antigenen auf den Bereich zwischen den Aminosäuren 272 und 538 des T-Antigen eingegrenzt werden. Vor kurzem wurde beim großen Polyoma T-Antigen ebenso wie beim SV40 T-Antigen durch oxATP-Affinitätsmarkierung eine Nukleotidbindungsstelle entdeckt (Clertant und Cuzin, 1982; Clertant et al., 1984), welche zumindest im Fall von Polyoma T-Antigen verschieden von der ATPase-Substratbindungsstelle sein soll. Zu diesem Schluß kamen Clertant et al., da die optimalen Konditionen für ATPase-Reaktion und Affinitätsmarkierung sehr verschieden sind, z.B. benötigt die Affinitätsmarkierung Ca^{2+} oder Mg^{2+} -Ionen, während die ATPase-Aktivität durch Ca^{2+} stark gehemmt wird. K_M -Werte und Hill-Koeffizienten sagen für die Nukleotidbindung Kooperativität vorher, jedoch nicht für die

ATP-Hydrolyse. Diese Argumente sind jedoch kein endgültiger Beweis dafür, daß nicht die Nukleotidbindungsstelle für beide Eigenschaften dieselbe sein könnte, die ATP-Bindung ein nichtlimitierender Schritt im katalytischen ATP-Spaltungsprozeß ist und die für die ATPase-Reaktion ungünstigen Bedingungen sich in einem anderen Schritt der Reaktion auswirken. Die Behinderung der ATPase-Reaktion im Gegensatz zur Affinitätsmarkierung (Clertant et al., 1984) durch bestimmte monoklonale Antikörper könnte ebenfalls auf einem Effekt bei der Spaltung, nicht aber bei der Nukleotidbindung zurückzuführen sein.

Im Hinblick auf die für die Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung verantwortliche allosterische ATP-Bindungsstelle lassen sich zwar Ähnlichkeiten mit der durch Affinitätsmarkierung entdeckten ATP-Bindungsstelle hinsichtlich der breiten Nukleotidspezifität - beide binden mehrere Nukleotide - und der Tatsache, daß der K_m für die Affinitätsmarkierung ungefähr dem der ATP-Konzentration entspricht, mit der 50 %ige Inhibition der DNA-Bindung erreicht wird, erkennen, jedoch scheinen die Gegensätze zu überwiegen. So läßt sich das T-Antigen über Affinitätsmarkierung gleichgut mit radioaktivem oxidierten ATP wie mit UTP markieren: UTP hat keinen meßbaren Effekt auf die DNA-Bindung. Auch benötigt die Affinitätsmarkierung wie schon erwähnt Mg^{2+} - oder Ca^{2+} -Ionen, die Inhibition der DNA-Bindung ist davon unabhängig. Deletionsmutanten, welche die Affinitätsmarkierungsstelle enthielten, zeigten keine ATP induzierte DNA-Bindungsinhibition (Abb. 4.18, 4.19). Dieser letzte Punkt könnte jedoch auf das Fehlen großer Teile der Proteine, die für die Einnahme der Nukleotid-bindenden Konformation nötig sind, zurückgeführt werden. Es ist eine T-Antigenmutante bekannt (dl 1135, Clark et al., 1983) die, obwohl sie nur eine sehr kleine Deletion (33 bp) im aminoterminalen Bereich des T-Antigen-Gens trägt, keine DNA-Bindungsaktivität und keine ATPase-Aktivität mehr zeigt. Man vermutet hier, daß Veränderungen der aminoterminalen

Region eine Veränderung der Tertiärstruktur des Moleküls zur Folge hat und somit andere Eigenschaften oder Aktivitäten des Proteins beeinflußt werden, obwohl die aminoterminalen Sequenzen nicht direkt an der DNA-Bindung oder ATPase-Aktivität teilhaben (Rigby and Lane, 1983). Es wird zwar durch die Resultate von Clark et al. (1983) nicht widerlegt, daß getrennte Domänen des T-Antigens für ATPase-Aktivität oder "origin"-DNA-Bindung zuständig sind, jedoch ist es genauso wahrscheinlich, daß durch die Faltung des Proteins im nativen T-Antigen eine Wechselwirkung unter den verschiedenen Aktivitäten entsteht. Hieraus könnte sich auch eine mögliche Erklärung der sich anscheinend widersprechenden Ergebnisse der Mutanten D2, T_{pst} und T_{HindIII} ergeben. Da im D2-Molekül ganz andere Sequenzen fehlen als bei T_{HindIII} und beide keine ATP-induzierte DNA-Bindungsinhibition mehr zeigen, könnte man ebenfalls schließen, daß zumindest bei einem der beiden T-Antigene nicht die ATP-Bindungsstelle deletiert ist, sondern daß zur Einnahme der allosterischen Konformation nötige Sequenzen fehlen.

Im Fall der T_{HindIII}-Mutante könnte man auch argumentieren, daß ein in E.coli exprimiertes eukaryontisches Protein vielleicht nicht genau genug dem zellulären Protein entspreche. Die ebenfalls in E.coli exprimierte T_{pst}-Mutante zeigt jedoch sowohl DNA-Bindung und Nukleotidaffinitätsmarkierung als auch Inhibition der DNA-Bindung, das Molekül scheint dem Protein aus Säugerzellen sehr ähnlich zu sein und es ist daher nicht unwahrscheinlich, daß auch die T_{HindIII}-Mutante von der Funktion her intakt ist, die allosterische ATP-Effektorstelle jedoch verloren hat. Aufgrund dieser experimentellen Ergebnisse scheint es fast unmöglich, daß die allosterische ATP-Bindungsstelle und die affinitätsmarkierte ox-ATP-Bindungsstelle ein und dieselbe Stelle sein sollten. Zudem ergab sich in Bezug auf die Lage der ox-ATP-Bindungsstelle eine Diskrepanz zwischen den

Ergebnissen von Clertant et al. und denen der T-Antigenmutanten. So kartierten Clertant et al. die Bindungsstelle anhand von Deletionsmutanten in den Bereich zwischen Aminosäure 413 - 528, die Mutante $T_{HINDIII}$ wurde jedoch durch oxidiertes radioaktives ATP ebenfalls markiert, obwohl sie nur T-Antigen-Sequenzen bis zur Aminosäure 272 enthält. Dagegen wird das kleine t-Antigen nicht durch Affinitätsmarkierung mit oxATP markiert (U.Markau und E.Fanning, pers. Mitteilung). So liegt die ox-ATP-Affinitätsmarkierungsstelle diesen Resultaten und denen mit der D2-Mutante zufolge entweder zwischen den Aminosäuren 115 und 272, oder aber es gibt zwei verschiedene oxATP-Bindungsstellen, eine im von Clertant et al. vorgeschlagenen Bereich und zusätzlich eine andere mehr zum Aminoterminus hin gelegene.

5.3. Vergleich der allosterischen Nukleotid-Bindungsstelle mit der ATPase-Substratbindungsstelle

Die Untersuchungen zur ATPase-Substratbindungsstelle lassen auf mehr Ähnlichkeit dieser zur allosterischen ATP-Bindungsstelle schließen, jedoch nur wenn man voraussetzt, daß die ATPase-Substratbindung unabhängig von der katalytischen Aktivität ist. Die katalytische ATP-Hydrolyse ist nämlich bei der T-Antigen-Mutante, die die Zelllinie H65-90B exprimiert, nicht vorhanden (Huber et al., 1985), das T-Antigen zeigt jedoch ATP induzierte Inhibition der DNA-Bindung (Abb.4.9). Im Falle des Wildtyp-T-Antigens inhibiert der monoklonale Antikörper 204 die ATP-Hydrolyse, aber mit diesem Antikörper war die DNA-Bindung ebenso stark inhibiert wie mit allen anderen untersuchten Antikörpern (Abb.4.5). Da aber die Zugabe der verschiedenen Nukleotide die ATPase-Aktivität mit der gleichen Spezifität inhibiert wie die DNA-Bindungsaktivität (Abb.4.20), könnte man sich vorstellen, daß die Nukleotide, welche den allosterischen Effekt erzeugen, an die ATPase-Substratbindungsstelle

binden, damit die Stelle für ATP blockieren und aufgrund dessen keine Spaltung mehr stattfinden kann. Möglicherweise ist daher die ATPase-Substratbindungsstelle identisch mit der allosterischen Nukleotidbindungsstelle. Daß auch das spaltbare ATP die DNA-Bindung, vor allem auch bei 37°C, wo die ATP-Hydrolyse stark ist, inhibiert, kann vielleicht mit der Konzentration des vorhandenen ATP erklärt werden. Bei Hydrolyseaktivitäten von ca. 100 pmol/h bei der im Probenvolumen enthaltenen T-Antigenmenge (Clark et al., 1984) sind eben schon mikromolare Mengen von ATP genug, die Substratbindungsstelle permanent besetzt zu halten. Im Falle von dATP, dessen Zugabe im Experiment (Abb.4.20) die Spaltung des radioaktiven ATP stark inhibierte, könnte die Erklärung der Inhibition darin liegen, daß Spaltung von dATP ($K_M = 0,5 \mu M$) bevorzugt gegenüber der von ATP ($K_M = 4 \mu M$) geschieht. In Anbetracht dieser Konkurrenz wäre es möglich, daß nur noch ca. 10% γ - ^{32}P -ATP gespalten würden, die Kriterien für die Inhibition der T-Antigen-DNA-Bindung durch dATP jedoch die gleichen wie bei ATP selbst wären, nämlich die hohe Konzentration gegenüber der im Vergleich geringen Spaltungsaktivität.

Wäre die ATPase-Substratbindungsstelle tatsächlich die allosterische Effektorstelle, so müßte sie vor dem Carboxyterminus der T_{PsT}-Antigenmutante liegen. Mit zusätzlichen anderen Deletions- bzw. Punktmutanten könnte dies in Zukunft erforscht werden.

Vorerst ist es unmöglich, die allosterische Effektorstelle mit Sicherheit einer der beiden beschriebenen Nukleotidbindungsstellen, sofern diese beiden tatsächlich unterschiedlich sind, zuzuordnen. Es bleibt daher noch die Möglichkeit offen, daß die allosterische Nukleotidbindungsstelle eine dritte bisher unbekannte Bindungsstelle ist, was jedoch auf Grund der Größe des T-Antigenmoleküls und bisheriger Untersuchungen über die Aminosäuresequenzen von Nukleotidbindungsstellen anderer

durch Nukleotide beeinflusster Proteine nicht sehr wahrscheinlich ist.

5.4. Mögliche Auswirkungen der allosterischen Nukleotid-Bindung des T-Antigens auf den zellulären Infektionszyklus

ATP-Bindung und darausfolgende Beeinflussung der Aktivitäten von verschiedenen Proteinen, welche Einfluß auf die Replikation oder Rekombination haben, wurde bereits für mehrere Proteine beobachtet. So aktiviert Bindung von ATP allosterisch die Bindung von *E.coli* dnaB Protein an einzelsträngige DNA (Arai and Kornberg, 1981; Nakayama et al., 1984). Ebenso benötigt die sequenz-spezifische Bindung der Tn3-Transposase an die inverted repeats des Transposons die Anwesenheit von ATP (Wishart et al., 1985). Dagegen wird die Aktivität der gereinigten Topoisomerase I aus HeLa oder *Cistilago maydis* Zellen durch physiologische Konzentrationen von ATP oder seiner Analoga inhibiert (Rowe et al., 1981; Low and Holden, 1985). Welche biologischen Auswirkungen diese negative Regulation durch ATP in der Zelle hat, bleibt unklar, da man davon ausgeht, daß sowohl die T-Antigen DNA-Bindungsaktivität als auch die Topoisomerase in der Zelle aktiv sind, und Schätzungen der zellulären ATP-Konzentrationen sich auf ungefähr 5 mM (Ackerboom et al., 1978; Rapaport et al., 1979) ATP belaufen.

Dieser scheinbare Widerspruch könnte für T-Antigen jedoch auf verschiedene Arten erklärt werden. Entweder könnten Zellen einen Faktor enthalten, der das T-Antigen vor Bindung von ATP schützt, wogegen aber das mit zellulärem Rohextrakt durchgeführte Experiment (Abb.4.8) spricht. Oder aber die Bindung von ATP an T-Antigen und die damit verbundene Inhibition der Bindung von T-Antigen an DNA könnte ein vorübergehender Effekt, der mit einem zeitweisen Konformationswechsel des T-Antigens verbunden ist. Möglicherweise spielt ein solcher Konformationswechsel dann

bei der Initiation oder der Elongation der DNA-Replikation eine Rolle. Andererseits benötigen in vitro-Replikationsversuche 2-5 mM ATP um effektiv abzulaufen. Ob man jedoch die Bedingungen für in vitro Versuche mit den für tatsächlichen physiologischen Ereignisse benötigten, gleichsetzen kann, ist fraglich.

Auch die vor kurzem beschriebene Helicase-Aktivität des T-Antigens (Stahl et al., 1986) könnte möglicherweise im Zusammenhang mit der beobachteten allosterischen Inhibition der DNA-Bindung des T-Antigens stehen. Es wurde gezeigt, daß das große T-Antigen unter Verbrauch von ATP und bei Vorhandensein freier Einzelstrang-DNA-Sequenzen fähig ist, die beiden Stränge an der Replikationsgabel der viralen DNA zu entwinden. Die ATPase-Aktivität und die Helicase-Aktivität scheinen hierbei untereinander verbunden zu sein, denn Antikörper, die die ATPase-Aktivität negativ beeinflussen, hemmen auch die Helicase-Aktivität des T-Antigens (Stahl et al., 1986). Das Vorhandensein von ATPase-Aktivität scheint also notwendige Voraussetzung für die Funktion der Helicase-Aktivität zu sein. Dies würde erklären, warum ATPase-negative T-Antigenmutanten unfähig sind, die Replikation der SV40-DNA zu bewirken, da die notwendige vorherige Entwindung der beiden DNA-Stränge nicht durchgeführt werden kann. Zwar ist es fraglich, ob die ATP-induzierte Allosterie bei der tatsächlichen Entwindung der DNA-Stränge eine Rolle spielt, denn ATP-induzierte DNA-Bindungsinhibition und Helicase-Aktivität unterscheiden sich u.a. darin, daß die Helicase sowohl ATPase-Aktivität, als auch das Vorhandensein von Magnesiumionen benötigt, was bei der DNA-Bindungsinhibition des T-Antigens durch ATP nicht der Fall ist. Ebenso ist Vorhandensein von Einzelstrang-DNA keine notwendige Voraussetzung für die DNA-Bindungsinhibition. Jedoch wird für die Replikation außer der ATPase-Aktivität und "origin"-DNA-Bindung noch eine zusätzliche unbekannte Funktion des T-Antigen benötigt (Stillman et al., 1985). Möglicherweise liegt diese Funktion

darin, doppelsträngige DNA, an die T-Antigen gebunden ist, in einzelsträngige DNA, welche für die Helicase-Aktivität nötig ist, umzuwandeln und damit die Voraussetzungen für eine DNA-Replikation zu schaffen. Ob die allosterische Beeinflussung der DNA-Bindung des T-Antigens durch ATP hierbei eine Rolle spielen könnte, ist aus den bisherigen Ergebnissen noch nicht abzusehen. Ein Hinweis, der eher dagegen spricht, daß hier eine Funktion der ATP-induzierten Allosterie zu finden wäre, ist das Ergebnis der Untersuchung des D2-T-Antigens. Dieses zeigt keine Allosterie und damit verbundene T-Antigen-DNA-Bindungsinhibition (Abb.4.16), besitzt aber ATPase-Aktivität und bewirkt auch DNA-Replikation (Tjian and Robbins, 1979).

Es bleiben aber als mögliche Funktionen der ATP-induzierten DNA-Bindungsinhibition noch andere Möglichkeiten; so könnte ATP durch ein Inhibieren der Bindung des T-Antigens an DNA verhindern, daß T-Antigen seine eigene Produktion sofort stoppt und erst nach einem Ansteigen der T-Antigen-Konzentration in der Zelle über einen bestimmten Wert eine Autoregulation zulassen. Die ATP-Inhibition der DNA-Bindung könnte daher ein für den metabolischen Zustand einer Zelle, wie für die Zahl der infizierenden SV40 Genome und deren Expressionsaktivität sensitives Mittel zur Regulation sein. So existieren Mutanten (z.B. dl 1058, Clark et al., 1983) die etwa gleichlang sind wie T_{Pst} und in vitro an "origin"-DNA binden, jedoch keine ATPase-Aktivität mehr besitzen und in vivo keine Autoregulation durchführen können. Möglicherweise haben diese Mutanten noch die allosterische ATP-Bindungsstelle, die eventuell mit der ATPase-Substratbindungsstelle übereinstimmt (Abb.4.20), sie können ATP binden, aber nicht spalten, und vielleicht aus diesem Grund keine Autoregulation mehr durchführen. Auch andere Eigenschaften des T-Antigens wie z.B. Regulation der zellulären DNA-Replikation oder Bindung an das zelluläre Protein p53 oder Eigenschaften bei der Transformation könnten von Nukleotidbindung betroffen sein.

Welche Menge ATP in der Zelle dem T-Antigen tatsächlich zur Verfügung steht, ist außerdem schwierig festzustellen. Möglicherweise sind diese Mengen sehr verschieden von den durch Isolierung aus Zellen berechneten Mengen. Eine Vielzahl von Enzymen und Proteinen, die ATP binden und verbrauchen, könnte die tatsächliche verfügbare Konzentration gegenüber der berechneten stark herabsetzen. Sehr viele Faktoren einer möglichen physiologischen Bedeutung des beobachteten die DNA-Bindung inhibierenden Effekts von ATP und verwandten Nukleotiden auf das T-Antigen sind noch unklar.

Man kann aber sicher davon ausgehen, daß diese Inhibition eine wichtige Eigenschaft des T-Antigens ist. Zukünftige Arbeiten werden zeigen, ob und wenn ja, welchen Einfluß diese Eigenschaft auf den Infektionszyklus der Zelle hat.

6. Zusammenfassung

Das große Tumor-Antigen (T-Antigen) des Simian Virus 40 (SV40) besitzt mehrere biochemische Aktivitäten auf verschiedene Domänen des Moleküls verteilt. Darunter sind sequenz-spezifische Bindung an zwei bestimmte Stellen innerhalb der Kontrollregion der viralen DNA, ATPase-Aktivität und Nukleotidbindungsaktivität. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die spezifische Bindung des T-Antigens an die Bindungsstellen I und II im viralen "origin"-Bereich durch Zugabe von niedrigen Konzentrationen von Purinnukleosidtriphosphaten und deren unspaltbarer oder schwefelhaltiger Analoga AMP-PNP und ATP γ S stark inhibiert wird. Die Inhibition der DNA-Bindung ist bei Entfernen von Nukleotid reversibel, was gegen eine kovalente Modifikation des T-Antigens spricht. Außerdem konnte gezeigt werden, daß es sich bei der DNA-Bindungsinhibition des T-Antigens nicht um eine Konkurrenz der beiden Liganden Nukleotid und DNA um dieselbe Bindungsstelle handelt. Vielmehr sind alle Kriterien für eine allosterische Beeinflussung des T-Antigen-Moleküls durch Bindung dieser Nukleotide an das Protein erfüllt. Demnach kann T-Antigen abhängig davon welcher Ligand anwesend ist in zwei Konformationen vorliegen: einer Nukleotid-bindenden und einer DNA-bindenden Form.

Anhand der Ergebnisse mit Deletionsmutanten des T-Antigens wird vermutet, daß die Bindungsstelle der Nukleotide zwischen den Aminosäuren 272 und 537 des T-Antigens liegt. Die mögliche Verbindung dieser allosterischen Nukleotidbindungsstelle mit den bisher beschriebenen Nukleotid- und ATPase-Substrat-Bindungsstellen wird diskutiert.

7. Literaturverzeichnis

- Ackerboom, T., H. Bookelman, P. Zuurendonk, R. Meer and J. Tager. Intramitochondrial and extramitochondrial concentrations of adenine nucleotides and inorganic phosphate in isolated hepatocytes from fasted rats. 1978. Eur. J. Biochem. 84: 413-420.
- Adams, J. 1981. Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. J. Histochem. Cytochem. 29: 775.
- Arai, K. and A. Kornberg. 1981. Mechanism of dnaB protein action. III. Allosteric role of ATP in the alteration of DNA structure by dnaB protein in priming replication. J. Biol. Chem. 256: 5260-5266.
- Ball, R.K., B. Siegl, S. Quellhorst, G. Brandner and D.G. Braun. 1984. Monoclonal antibodies against simian virus 40 large T tumor antigen: Epitope mapping, papova virus cross-reaction and cell surface staining. EMBO J. 3: 1485-1491.
- Black, P.H. and W.P. Rowe. 1963. An analysis of SV40-induced transformation of hamster kidney tissue in vitro. I. General characteristics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50: 606-613.
- Bradley, M.K., J. Hudson, M. Villanueva and D.M. Livingston. 1984. Specific in vitro adenylylation of the simian virus 40 large T antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6574-6578.
- Brady, J. and G. Khoury. 1985. trans Activation of the simian virus 40 late transcription unit by T antigen. Mol. Cell Biol. 5: 1391-1399.
- Brady, J., J. Bolen, M. Radonovich, N. Salzman and G. Khoury. 1984. Stimulation of simian virus 40 late

gene expression by simian virus 40 tumor antigen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2040-2044.

Clark, R., D.P. Lane and R. Tjian. 1981. Use of
monoclonal antibodies as probes of simian virus 40
T antigen ATPase activity. J. Biol. Chem. 256:
11854-11858.

Clark, R., K. Peden, J. Pipas, D. Nathans and R. Tjian.
1983. Biochemical activities of T antigen proteins
encoded by simian virus 40 A gene deletion mutants.
Mol. Cell Biol. 3: 220-228.

Clark, R., M.J. Tevethia and R. Tjian. 1984. The ATPase
activity of SV40 large T-antigen. The Cancer Cell,
Vo. 2. Cold Spring Harbour, 3 edition: 363-368.

Clertant, P. and F. Cuzin. 1982. Covalent affinity
labeling by periodate-oxidized (α - ^{32}P)ATP of the
large T proteins of polyoma and SV40 viruses. J.
Biol. Chem. 257: 6300-6305.

Clertant, P., P. Gaudray, E. May and F. Cuzin. 1984. The
nucleotide binding site detected by affinity labeling
in the large T protein of polyoma and SV40 viruses is
distinct from their ATPase catalytic site. J. Biol.
Chem. 259: 15196-15204.

Defendi, V. and F. Jensen. 1967. Oncogenicity by DNA tumor
viruses: Enhancement after ultraviolet and cobalt 60
radiations. Science (Washington, D.C.) 157: 703-705.

DiMaio, D. and D. Nathans. 1980. Cold sensitive regulatory
mutants of simian virus 40. J. Mol. Biol. 140:
129-142.

DiMaio, D. and D. Nathans. 1982. Regulatory mutants of
simian virus 40. Effect of mutations at a T antigen
binding site on DNA replication and expression of
viral genes. J. Mol. Biol. 156: 531-548.

- Dixon, R. and D. Nathans. 1985. Purification of simian virus 40 large T antigen by immunoaffinity chromatography. *J. Virol.* 53: 1001-1004.
- Dubbs, D.R., S. Kit, R.A. De Torres and M. Anken. 1967. Virogenic properties of bromodeoxyuridine-sensitive and bromodeoxyuridine-resistant simian virus 40-transformed mouse kidney cells. *J. Virol.* 1: 968-979.
- Ey, P.L., S.J. Prowse and C.R. Jenkin. 1978. Isolation of pure IgG 1, IgG 2a and IgG 2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose. *Immunochemistry* 15: 429-436.
- Fanning, E., B. Nowak and C. Burger. 1981. Detection and characterization of multiple forms of SV40 large T antigen. *J. Virol.* 37: 92-102.
- Fanning, E., K.-H. Westphal, D. Brauer and D. Cörlin. 1982. Subclasses of simian virus 40 large T antigen: differential binding of two subclasses of T antigen from productively infected cells to viral and cellular DNA. *EMBO J.* 1: 1023-1028.
- Fanning, E., C. Burger, B. Huber, U. Markau, S. Sperka, S. Thompson, E. Vakalopoulou and B. Vogt. 1984. How does SV40 T antigen control initiation of viral DNA replication? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 179: 241-249.
- Fiers, W., R. Contreras, G. Haegeman, R. Rogiers, A. van de Voorde, H. van Heuverswyn, J. van Herrewegne, G. Volckaert and M. Ysebaert. 1978. Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* 273: 113-120.
- Gey, G.O., W.D. Coffman and M.T. Kubicek. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12: 264-265.

- Giacherio, D. and L.P. Hager. 1979. A poly(dT)-stimulated ATPase activity associated with Simian virus 40 large T-antigen. *J. Biol. Chem.* 245: 8113-8116.
- Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23: 175-182.
- Goldman, N., M. Brown and G. Khoury. 1981. Modification of SV40 T antigen by poly-ADP-ribosylation. *Cell* 24: 567-572.
- Graessmann, A., M. Graessmann, R. Tjian and W.C. Topp. 1980. Simian virus 40 small-t protein is required for loss of actin cable networks in rat cells. *J. Virol.* 33: 1182-1191.
- Gurney, E.G., S. Tamowosky and W. Deppert. 1986. Antigenic binding sites of monoclonal antibodies specific for Simian virus 40 large T-antigen. *J. Virol.* im Druck.
- Hanks, J.M. and D.E. Wallace. 1949. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71: 196.
- Hansen, U., D. Tenen, D. Livingston and P. Sharp. 1981. T antigen repression of SV40 early transcription from two promoters. *Cell* 27: 603-612.
- Harlow, E., L.V. Crawford, D.C. Pim and N.M. Williamson. 1981. Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J. Virol.* 39: 861-869.
- Hassel, J.A., E. Lukanidin, G. Fey and J. Sambrook. 1978. The structure and expression of two defective adenovirus 2 - Simian virus 40 hybrids. *J. Mol. Biol.* 120: 209-247.
- Hinzpeter, M., E. Fanning and W. Deppert. 1986. A new sensitive target-bound DNA binding assay for SV40 large T-antigen. *Virology* 148: 159-167.

- Huber, B., E. Vakalopoulou, C. Burger and E. Fanning. 1985. Identification and biochemical analysis of DNA replication-defective large T antigens from SV40-transformed cells. *Virology* 146: 188-202.
- Jones, K.A. and R. Tjian. 1984. Essential contact residues within SV40 large T antigen binding sites I and II identified by alkylation interference. *Cell* 36: 15-162.
- Keller, J. and J. Alwine. 1984. Activation of the SV40 late promoter: direct effects of T antigen in the absence of viral DNA replication. *Cell* 36: 381-389.
- Keller, J. and J. Alwine. 1985. Analysis of an activatable promoter: sequences in the simian virus 40 late promoter required for T antigen mediated trans activation. *Mol. Cell Biol.* 5: 1859-1869.
- Kessler, S.W. 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody absorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* 115: 1617-1624.
- Kit, S., T. Kurimura and D.R. Dubbs. 1969. Transplantable mouse tumor induced by injection of SV40-transformed mouse kidney cells. *Int. J. Cancer* 4: 384-392.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lane, D.P. and L.V. Crawford. 1980. The complex between Simian virus 40 T antigen and a specific host protein. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 210: 451-463.
- Lewis, A.M. Jr. and R.G. Martin. 1979. Oncogenicity of Simian virus 40 deletion mutants that induce altered 17-kilodalton t-protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4299-4302.

- Low, R. and J. Holden. 1985. Inhibition of HeLa cell DNA topoisomerase I by ATP and phosphate. Nucl. Acids Res. 13: 6999-7014.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Margolskee, R. and D. Nathans. 1984. Simian virus 40 mutant T antigens with relaxed specificity for the nucleotide sequence at the viral origin of replication. J. Virol. 49: 386-393.
- Martin, R.G., V.P. Wetlow, C.A.F. Edwards and D. Vembu. 1979. The roles of the Simian virus 40 tumor antigens in transformation of Chinese hamster lung cells. Cell 17: 635-643.
- Martin, R.G. 1981. The transformation of cell growth and transdifferentiation of DNA synthesis by Simian virus 40. Advances in Cancer Research 34: 1-68.
- McCormick, F. and E. Harlow. 1980. Association of a murine 53,000 dalton phosphoprotein with Simian virus 40 large T-antigen in transformed cells. J. Virol. 34: 213-224.
- Melnick, J.L.. 1962. Papova virus group. Science 135: 1128.
- Morrison, B., M. Kress, G. Khoury and G. Jay. 1983. Simian virus 40 tumor antigen: isolation of the origin-specific DNA binding domain. J. Virol. 47: 106-114.
- Nakayama, N., N. Arai, Y. Kaziro and K. Arai. 1984. Structural and functional studies of the dnaB protein using limited proteolysis. Characterization of domains for DNA-dependent ATP hydrolysis and for protein association in the primosome. J. Biol. Chem. 259:

88-96.

- O'Brian, S.J. (Herausgeber). 1984. Genetic maps. A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms 3. Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Prives, C., B. Barnet, A. Scheller, G. Khoury and G. Jay. 1982. Discrete regions of simian virus 40 large T antigen are required for nonspecific and viral origin-specific DNA binding. *J. Virol.* 43: 73-82.
- Rapaport, E., M. Garcia-Blanco and P. Zamecnik. 1979. Regulation of DNA replication in S phase nuclei by ATP and ADP pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1643-1647.
- Rigby, P. and D. Lane. 1983. The structure and function of SV40 large T antigen. *Adv. Viral Oncology* 3: 31-57.
- Rio, D., A. Robbins, R. Myers and R. Tjian. 1980. Regulation of simian virus 40 early transcription in vitro by a purified tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5706-5710.
- Robb, J.A. and K. Huebner. 1973. Effect of cell chromosome number on Simian virus 40 replication. *Exp. Cell Res.* 81: 120-126.
- Rowe, T., J. Rusche, M. Brougham and W. Holloman. 1981. Purification and properties of a topoisomerase from *Ustilago maydis*. *J. Biol. Chem.* 256: 10354-10361.
- Ryder, K., E. Vakalopoulou, R. Mertz, I. Mastrangelo, P. Hough, P. Tegtmeyer and E. Fanning. 1985. Seventeen base pairs of region I encode a novel tripartite binding signal for SV40 T antigen. *Cell* 42: 539-548.
- Scheidtmann, K.-H., B. Echle and G. Walter. 1982. Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J. Virol.*

44: 116-133.

- Shortle, D., R. Margolskee and D. Nathans. 1979. Mutational analysis of simian virus 40 replicon: Pseudorevertants of mutants with a defective replication origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6128-6131.
- Smith, A.E., R. Smith and E. Paucha. 1978. Extraction and fingerprint analysis of Simian virus 40 large and small T-antigen. J. Virol. 28: 140-153.
- Stahl, H., P. Dröge and R. Knippers. 1986. DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. Eingereicht bei EMBO Journal.
- Stillman, B., R.D. Gerard, R.A. Guggenheimer and Y. Gluzman. 1985. T-antigen and template requirements for SV40 DNA replication in vitro. EMBO Journal 4: 2933-2939.
- Sweet, B.H. and M.R. Hilleman. 1960. The vacuolating virus, SV40. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 105: 420.
- Takemoto, K.H., R.L. Kirschstein and K. Habel. 1966. Mutants of simian virus 40 differing in plaque sizes, oncogenicity and heat sensibility. J. Bacteriol. 92: 990-994.
- Tegtmeyer, P.. 1972. Simian virus 40 deoxyribonucleic acid synthesis: the viral replicon. J. Virol. 10: 591-598.
- Tjian, R., G. Fey and A. Graessmann. 1978. Biological activity of purified Simian virus 40 T antigen proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1279-1283.
- Tjian, R. and A. Robbins. 1979. Enzymatic activities associated with a purified simian virus 40 T-antigen related protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 610-614.
- Tjian, R., A. Robbins and R. Clark. 1980. Catalytic properties of the SV40 tumor antigen. Cold Spring

- Harbor Symp. Quant. Biol. 44: 103.
- Tooze, J. 1981. Molecular Biology of Tumor Virus: Part 2, DNA Tumor Viruses, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Topp, W.C. and D.B. Rifkin. 1980. The small-t protein of SV40 is required for loss of actin cable networks and plasminogen activator synthesis in transformed rat cells. Virology 106: 282-291.
- Topp, W.C., D.B. Rifkin and M.J. Sleight. 1981. SV40 mutants with an altered small-t protein are tumorigenic in newborn hamsters. Virology 111: 341-350.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.
- Twigg, A. and D. Sherratt. 1980. Trans-complementable copy number mutants of plasmid ColE1. Nature 283: 216-218.
- Vinograd, J., J. Morris, N. Davidson and W.F. Dove, jr. 1963. The bouyant behavior of viral and bacterial DNA in alkaline CsCl. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 49: 12-17.
- Van Roy, F., L. Fransen and W. Fiers. 1983. Improved localization of phosphorylation sites in simian virus 40 large T antigen. J. Virol. 45: 315-331.
- Wishart, W., J. Broach and E. Ohtsubo. 1985. ATP-dependent specific binding of Tn3 transposase to Tn3 inverted repeats. Nature 314: 556-558.
- Zarling, J.M. and S.S. Tevethia. 1973. Transplantation immunity of Simian virus 40 transformed cells in tumor bearing mice. I. Development of cellular immunity to simian virus 40 tumor specific

transplantation antigens during genesis by
transplanted cells. J. Nat. Cancer Inst. 50: 137.

8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMP-PCP	Adenyl(yl)(β , γ -methylen)-diphosphat
AMP-PNP	Adenyl(yl)-imidodiphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
DME	Dulbecco modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)- N,N'-Tetraessigsäure
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunde(n)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'- 2-ethansulfonsäure
kD	Kilodalton
mA	Milliampere
MES	2(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
NP-40	Nonidet P-40
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfon-säure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pfu	Plaque forming units
RNase	Ribonuklease
S	Svedberg (Sedimentationsgeschw.)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV 40	Simian Virus 40
T-Antigen	großes Tumor-Antigen

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA-Puffer (wenn nicht anders angegeben)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit
ug	Mikrogramm
ul	Mikroliter
uM	mikromolar

Lebenslauf

Name	Brigitte Beatrix Vogt
Geburtsdatum	7. Dezember 1957
Geburtsort	München
Eltern	Gustav Vogt Irmgard Vogt, geb. von Reigersberg
1964 - 1968	Grundschule in Grünwald
1968 - 1977	Theodolinden-Gymnasium, München
1977	Abitur
1977 - 1982	Chemiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1980	Diplom-Vorprüfung nach dem 5. Semester
Juli 1982	Diplom-Hauptprüfung im 10. Semester
Sept. 1982 - Sept. 1983	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. E. Fanning-Honegger am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München (Thema: "Selektion und Klonierung von Simian Virus 40 T-Antigen bindenden Sequenzen des Affennierenzellgenoms")
Okt. 1983 - April 1986	Doktorarbeit am selben Institut (Thema: "Allosterische Kontrolle der Bindung von T-Antigen an SV40-DNA durch Purinnukleosidtriphosphate")

